



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*
EN MODELO MURINO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. DE ALBA ALVARADO MARIANA CITLALLI

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. PAZ MARÍA SILVIA SALAZAR SCHETTINO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, SEPTIEMBRE, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/682/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **17 de mayo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **DE ALBA ALVARADO MARIANA CITLALLI** con número de cuenta **302096190** con la tesis titulada **“RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MODELO MURINO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PAZ MARÍA SILVIA SALAZAR SCHETTINO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARTHA IRENE BUCIO TORRES
Vocal: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Vocal: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN CORNEJO
Secretario: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 03 de agosto de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales:

- Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- A continuación, a los apoyos económicos recibidos:

Beca CONACYT

Este estudio fue financiado parcialmente por DGAPA/PAPIIT, IN-216118 (registro FM/025/2015) e IN-211613 (registro FM/074/2012). Asignación presupuestal, Facultad de Medicina (FM/DI/022/2017 y FM/DI/090/2018).

Al Laboratorio Nacional de Citometría LabNalCit-UNAM (CONACYT).

Al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina UNAM.

Al Tutor Principal y a los miembros del Comité Tutor.

A la Dra. Paz María Salazar Schettino por su apoyo en la asesoría, estructuración y desarrollo del proyecto, además valiosas recomendaciones y aportaciones a este trabajo en la revisión de tesis.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo por su apoyo en la generación de este proyecto; tutoría en todos los aspectos inmunoquímicos, valiosas propuestas y revisión de tesis.

A la Dra . María Gloria Soldevilla Mergalejo por su apoyo en la fundamentación de la citometría de flujo, asesorías inmunológicas y revisión de tesis.

Agradecimientos a título personal:

A la Dra. Martha Bucio Torres por su apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto, la crítica del proyecto y revisión.

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo, por su apoyo en los aspectos parasitológicos y del transmisor referidos en esta tesis.

A la Dra. Elia Torres Gutiérrez y a la Bióloga Olivia Reinoso por su apoyo en la caracterización antigénica y estandarización de la prueba de ELISA en modelo murino.

A la M. en C. Yolanda Guevara por el mantenimiento de los aislados y proporcionarlos para el desarrollo de este trabajo.

A la M en C. Berenice Gonzales Rete por su apoyo para la obtención de muestras serológicas en modelo murino.

Al Biólogo Mauro Omar Vences Blanco por su ayuda en el mantenimiento de la cepa en modelo murino.

A la Dra. Roxana Olguín Alor Coordinadora de Investigación del LabNalCit por su apoyo en el análisis citométrico de muestras linfocitarias.

A la Dra. Sandra Amyris Ortega Francisco coordinadora de docencia del LabNalCit por el apoyo en la estandarización de la estimulación linfocitaria

Al M en C . Arimelek Cortés Hernández por su apoyo en el análisis y elección del panel de fluorocromos para el equipo NEXT.

Al M en C Eugenio Contreras Castillo por su apoyo en la estandarización de la tinción de viabilidad linfocitaria.

Dedicatoria

A mí madre Lidia Alvarado Meléndez a mis hermanos y hermana.

A todas las personas que me apoyaron en este proceso.

A mi acompañante canino Enola.

INDICE	PAGÍNA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
• Agente etiológico	5
• Ciclo biológico	6
• Fases clínicas de la enfermedad de Chagas	7
• Diagnóstico y tratamiento	8
• Mecanismos patogénicos de la cardiopatía en la enfermedad de Chagas	9
• Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas	10
• Fibrosis en la enfermedad de Chagas	14
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVO GENERAL	15
HIPÓTESIS	16
METODOLOGIA	16
RESULTADOS	19
• Parasitemia y parasitismo	19
• Análisis histopatológico	20
• Composición del infiltrado	22
• Localización del infiltrado	23
• Prevalencia del daño fibrótico	25
• Determinación de anticuerpos en modelo murino	26
• Correlación entre las variables estudiadas	28
• Fenotipificación de las poblaciones de tejido cardiaco	34
• Análisis estadísticos	28
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	35
PERSPECTIVAS	36
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36
ANEXO (artículo requisito para la obtención del grado)	44

RESUMEN

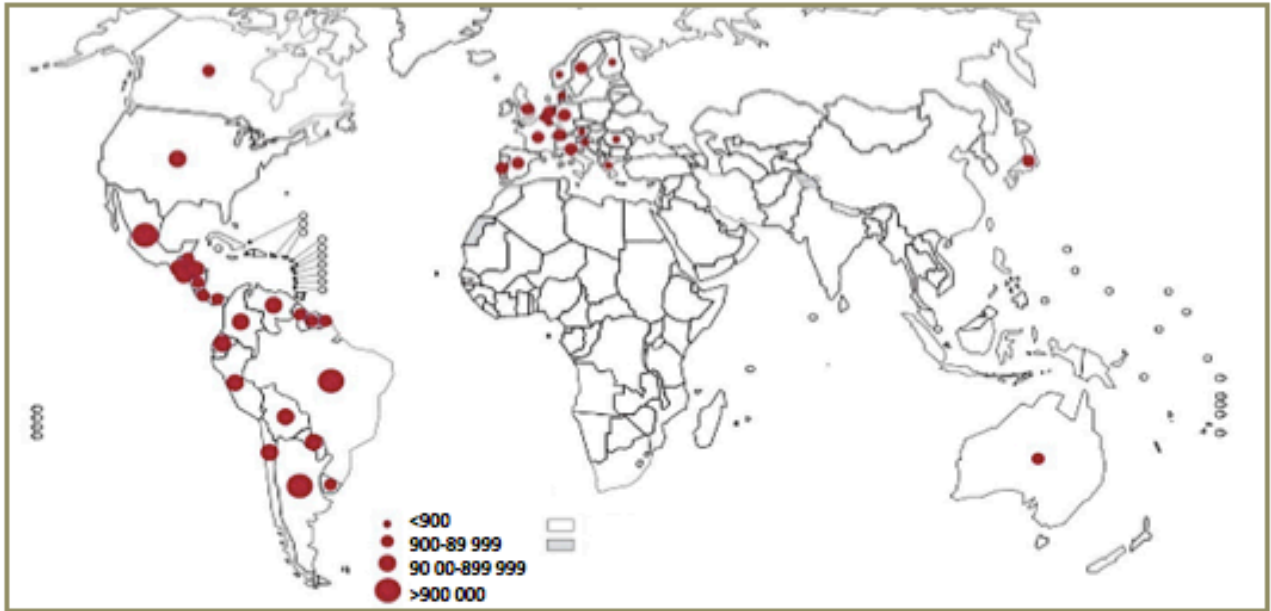
En la enfermedad de Chagas la cardiopatía es una manifestación irreversible de la fase crónica. Existe controversia para definir las causas de progresión de la fase aguda a la crónica. Este trabajo tiene como objetivo definir las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas, mediante la presencia del parásito infiltrado linfocitario y fibrosis, para determinar la evolución de la enfermedad en modelo murino. Se infectaron 50 ratones CD1 por vía intraperitoneal con *T. cruzi* y 30 ratones con solución salina como grupo control, se cuantificó parasitemia y se realizó cortes de corazón y tinción con HE y Masson. Los títulos de IgG se determinaron por prueba de ELISA. Se identificó un incremento significativo de la parasitemia a partir del día 15 después de la infección (dpi) con un máximo de 4.1×10^6 parásitos al 33 dpi y que finalizó a los 47 dpi; los nidos de amastigotes se observaron entre los 15-62 dpi. El análisis histológico del corazón mostró infiltrado linfocitario y lesiones fibróticas desde los 8 dpi hasta el final del estudio a los 100 dpi. Entre los 40-60 dpi se identificó incremento de células plasmáticas en miocardio con seropositividad determinada por ELISA entre los 40-60 dpi, se consideró como fase de transición y a los 62 dpi, y el inició la fase crónica caracterizada por ausencia de amastigotes con infiltrado y lesiones fibróticas con seropositividad. La correlación entre parasitemia y nidos de amastigotes ($r^2= 0.930$) y baja entre fibrosis con amastigotes ($r^2= 0.306$), y durante los 100 dpi fue entre fibrosis con infiltrado linfocitario ($r^2= 0.899$). El modelo murino es idóneo debido a que se pueden reproducir las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas en forma similar al humano. Se determinó la fase aguda entre los días 1-60 dpi y la crónica a partir del 62 dpi; el daño fibrótico se aprecia como consecuencia del infiltrado inflamatorio, el cual es constante, por otro lado, se identificó que la fibrosis inicia desde la fase aguda y es más aparente en la fase crónica. Así mismo en tejido cardiaco se identificó que el infiltrado inflamatorio se componía principalmente de células CD8⁺ productoras de interferón gama que a nivel local podrían estar implicadas en el daño que induce la cardiopatía de la enfermedad de Chagas.

ABSTRACT

In Chagas disease, heart disease is a common and irreversible manifestation of the chronic phase. There is controversy to define the causes of progression from the acute to the chronic phase. The objective of this work is to define the acute and chronic phases of Chagas disease, through the presence of the infiltrated lymphocytic parasite and fibrosis, to determine the evolution of the disease in a murine model. 50 CD1 mice were infected intraperitoneally with *T. cruzi* and 30 mice with saline as a control group, parasitaemia was quantified and heart sections and HE and Masson staining were performed. IgG titers were determined by ELISA test. A significant increase in parasitaemia was identified from day 15 after infection (dpi) with a maximum of 4.1×10^6 parasites at 33 dpi and ending at 47 dpi; amastigote nests were observed between 15-62 dpi. Histological analysis of the heart showed lymphocytic infiltrate and fibrotic lesions from 8 dpi to the end of the study at 100 dpi. Between 40-60 dpi, an increase in myocardial plasma cells with seropositivity determined by ELISA was identified between 40-60 dpi, it was considered a transition phase and at 62 dpi, and the chronic phase characterized by the absence of amastigotes with infiltrate began and fibrotic lesions with seropositivity. The correlation between parasitaemia and amastigote nests ($r^2 = 0.930$) and low between fibrosis with amastigotes ($r^2 = 0.306$), and during the 100 dpi it was between fibrosis with lymphocytic infiltrate ($r^2 = 0.899$). The murine model is ideal because can reproduce the acute and chronic phases of Chagas disease in a similar way to humans. The acute phase was determined between days 1-60 dpi and the chronic from 62 dpi; the fibrotic damage is seen as a consequence of the inflammatory infiltrate, which is constant, on the other hand, it was identified that fibrosis begins from the acute phase and is more apparent in the chronic phase. Likewise, in cardiac tissue it was identified that the inflammatory infiltrate was mainly composed of CD8⁺ cells that produce gamma interferon that at the local level they could be implicated in the damage induced by the heart disease of Chagas disease.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja, que involucra la interacción entre diversas especies de insectos triatomínicos vectores y diversos mamíferos silvestres, el transmisor puede tener ciclos peridomésticos y domésticos, y la enfermedad tiene varias formas de transmisión. En el humano, la evolución de la enfermedad se puede presentar con diversas manifestaciones clínicas. Esta enfermedad es causada por *Trypanosoma cruzi*, protozooario flagelado que en forma natural se transmite por insectos hematófagos llamados triatomínicos; este parásito intracelular fue descubierto en 1909 por el Dr. Carlos Chagas en Minas Gerais Brasil, quien describe gran parte del ciclo biológico al relacionar el parásito con el transmisor (*Panstrongylus megistus*) del cual aísla al parásito y reproduce la infección en animales de experimentación; además enfatiza las condiciones de vivienda rurales que se requieren para la propagación del vector (1); condiciones que aún prevalecen en nuestros días. Actualmente se estima que en el mundo existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas (2). La distribución de la enfermedad de Chagas en América se describe en 21 países endémicos del vector desde el sur de los EUA hasta el sur de Argentina y Chile (Imagen 1), dónde la infección natural se asocia a factores de riesgo como material de construcción de viviendas y otras características propias del ámbito rural que favorecen la infección; por esta razón la enfermedad de Chagas ha sido incluida dentro de las enfermedades desatendidas (3).



OMS 2009	OMS 2009	SSA MÉXICO 2000-2012	SSA MÉXICO 2013	OMS 2016-2018
Bancos de sangre 3- 53%	Enfermedades tropicales desatendidas	5 559 casos	678 casos	6-5 millones

Imagen 1. Distribución de la enfermedad de Chagas (7).

La infección por *T. cruzi* es adquirida por varios mecanismos, el más importante es el natural, el cual se lleva a cabo por medio de un triatomino infectado, esta forma de transmisión es muy común en áreas rurales. En las zonas urbanas, se presenta la transmisión por transfusión de sangre o sus componentes con mayor prevalencia. Otras formas de transmisión descritas son la transmisión materno fetal, vertical o connatal, alimentos contaminados con deyecciones del vector, ingestión del mismo y menos frecuentes los accidentes de laboratorio.

Actualmente es considerada un severo problema sanitario; en los últimos años se ha observado una mayor frecuencia de personas infectadas por transmisión transfusional y trasplantes de órganos en países como Estados Unidos de América, Canadá, algunos

Europeos y del Pacífico Occidental, lo anterior se atribuye a la movilidad poblacional entre América Latina y el resto del mundo (1).

Agente etiológico:

El agente causal se ubica dentro de la siguiente clasificación taxonómica (4).

Superreino: Eukaria
Reino: Protozoa
Infrarreino: Euglenozoa
Phylum: Euglenozoa
Clase: Kinetoplastida
Orden: Trypanosomatida
Familia: Trypanosomatidae
Género: *Trypanosoma*
Especie: *Trypanosoma. cruzi*

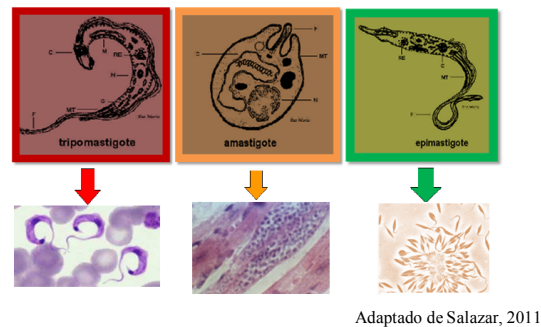


Imagen 2. Fases morfológicas del parásito

Las principales fases o estadios biológicos que presenta el parásito reciben varios nombres:

Tripomastigote (18- 21 μm).

Tripomastigote es la forma infectante; cuando se encuentra en las heces del vector se denomina tripomastigote metaciclístico y en sangre se conoce como tripomastigote sanguíneo el cual puede ser infectante en casos de transmisión transfusional (5).

Las formas sanguíneas al ser teñidas con Giemsa se observan en forma de C o S, con un núcleo rojo oscuro que es muy aparente en la parte media del cuerpo del parásito, el cinetoplasto violeta casi negro se localiza en la porción posterior donde sale el flagelo posterior al núcleo, el cual, dentro del cuerpo, forma lo que se conoce como membrana ondulante para salir por la porción posterior, el citoplasma se tiñe de azul, se observan gránulos violetas pálido (6).

Epimastigote (16 a 18 μm).

En el intestino medio del insecto y en los medios de cultivo convencionales se divide como epimastigote (5) esta fase que presenta forma de huso y al ser teñido con Giemsa, puede observarse el cinetoplasto que se ubica sobre el núcleo el cual se localiza en la parte central

del cuerpo. Los colores del núcleo y el cinetoplasto y citoplasma son semejantes a lo descrito anteriormente, el flagelo se origina del cinetoplasto y forma una pequeña membrana ondulante antes de salir por la parte anterior del parásito (6).

Amastigote (1.5- 4.0 μm)

Cuando el parásito se encuentra intracelular en los tejidos del vertebrado, recibe el nombre de amastigote, que es una forma esférica o subsférica aflagelar, se multiplica dentro células del huésped vertebrado (5). Al teñirse con Giemsa se puede observar el núcleo rojo muy aparente y el cinetoplasto junto a él en forma de bastoncillo azul intenso violeta (6).

Ciclo biológico

Cuando el trasmisor se alimenta de un mamífero infectado ingiere, junto con la sangre, al parásito circulante; en la luz del intestino se multiplica y se desarrollan hacia tripomastigotes metacíclicos (formas infectantes) que salen junto con las deyecciones, atraviesan piel o mucosas e infectan al mamífero donde circulan como tripomastigotes sanguíneos y posteriormente en forma intracelular como amastigotes, se multiplican por fisión binaria longitudinal dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear, tejido linfoide y muscular o nervioso; el ciclo se completa cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el transmisor (7).



Imagen 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Fases clínicas de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas tiene dos fases clínicas, la fase aguda y la fase crónica. La fase aguda se presenta en 5% de los infectados, con duración de 2 a 3 semanas y ocasionalmente hasta cuatro meses; los síntomas inician alrededor de 10 días después de la infección y en los casos de transmisión por transfusión sanguínea aparecen entre 20 y 40 días después; aproximadamente el 75% presenta signos y síntomas relacionados con la vía de entrada del parásito con manifestaciones sistémicas inespecíficas, principalmente fiebre; en 50% de los casos, cuando la vía de entrada es cercana a la mucosa ocular, se presenta el complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña-Mazza que consiste en edema bpalpebral unilateral de color violáceo ligeramente pruriginoso acompañado de adenopatías regionales; cuando la vía de entrada es en otra región, se denomina chagoma de inoculación (25%) que es una lesión nodular subcutánea también de color violáceo. En esta fase la parasitemia o presencia del parásito en sangre es muy evidente así como el parasitismo tisular o la presencia de nidos de amastigotes en tejido. Las manifestaciones sistémicas son inespecíficas; lo más frecuente es la fiebre poco elevada, mialgias, artralgias y hepato y/o esplenomegalia. Menos del 1% se complica con meningoencefalitis, miocarditis o pericarditis que se presentan con evolución generalmente fatal, especialmente en niños y ancianos.

La fase crónica asintomática (sin patología demostrada) puede durar de 10 a 20 años; sin embargo, en México se ha observado que los pacientes pueden cursar un periodo de 2 a 7 años entre la etapa aguda y la aparición de síntomas cardiovasculares (7); es clínicamente silenciosa con parasitemia muy baja, por lo que los métodos serológicos son de elección para el diagnóstico; después de esta fase se presenta la fase crónica sintomática en la que 27%, desarrollan lesiones cardíacas, 6 % digestivas, principalmente en esófago y colon, y 3% en el sistema nervioso periférico (7).

En la fase crónica sintomática (con patología demostrada), el órgano más afectado es corazón, con alteraciones en la contractilidad y conductibilidad con insuficiencia cardíaca progresiva y cardiomegalia; ésta es la causa de miocardiopatía infecciosa más frecuente del mundo, compromete varios tejidos cardíacos y presenta gran variedad de manifestaciones clínicas (7).

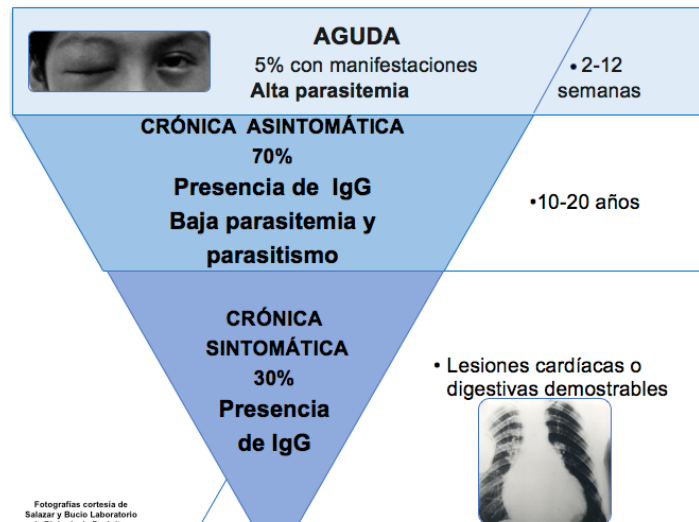


Imagen 4. Principales características de las fases clínicas en la enfermedad de Chagas.

Diagnóstico y tratamiento

Debido a la naturaleza de la enfermedad, los métodos diagnósticos para la enfermedad de Chagas, están divididos en métodos parasitológicos que consisten en la determinación de formas parasitarias y serológicos con la presencia de anticuerpos específicos presentes en suero de los pacientes infectados (7).

Durante la fase aguda, la demostración del parásito constituye el diagnóstico de certeza; sin embargo, sólo es posible detectar la forma sanguínea durante la fase aguda de la infección mediante la visualización del parásito por diferentes métodos: se utiliza examen directo en fresco, frotis, gota gruesa o microhematocrito, entre otros como el PCR. Durante la fase crónica asintomática y sintomática, el diagnóstico se confirma al demostrar la presencia de anticuerpos del huésped frente al parásito. Se debe obtener reactividad al menos en dos técnicas serológicas de distinto principio, ambas pruebas deben realizarse con la misma muestra de suero y utilizar, por lo menos, una de las pruebas consideradas de mayor sensibilidad como ELISA o IFI (Inmunofluorescencia indirecta) (7, 1).

Durante la fase crónica se utilizan estudios de gabinete, como son los radiológicos con placas de tórax, electrocardiografía y ecocardiografía.

Para el tratamiento de la enfermedad, existen dos medicamentos aprobados internacionalmente que son el Benznidazol y el Nifurtimox. En las miocardiopatías, el tratamiento generalmente se acompaña de antiarrítmicos e incluso colocación de marcapasos y en los casos más severos, trasplante de corazón (1).

Mecanismos patogénicos de la cardiopatía en la enfermedad de Chagas

Existen cuatro mecanismos patogénicos involucrados en la cardiopatía chagásica, que se relacionan con la presencia del parásito. El primero con un proceso inflamatorio tisular, que consiste en la lisis, liberación de componentes celulares, destrucción del tejido cardíaco e inflamación, como consecuencia de la presencia y reproducción del amastigote en el tejido cardíaco, donde experimentalmente se ha observado una correlación directa entre la presencia del parásito y el proceso inflamatorio tisular (8) e inclusive, cuando solo se confirma la presencia de antígenos o ADN de *T. cruzi* (9). El segundo mecanismo se relaciona con la presencia de trastornos autonómicos causados por el parasitismo directamente sobre neuronas cardíacas que provocan una intensa despoblación neuronal del miocardio y alteraciones degenerativas en las células de Schwann y fibras nerviosas que condicionan la presencia principalmente de arritmias y bloqueos con la presencia de áreas dissinérgicas en la función cardíaca que son manifestaciones características en la fase crónica (10,11,12). El tercer mecanismo se relaciona con la presencia de trastornos microvasculares con la formación de trombos plaquetarios que se generan por incremento en la adhesión plaquetaria al endotelio microvascular por la producción de endotelina que se genera por el proceso inflamatorio y por la presencia de una neuraminidasa parasitaria. Estos trastornos generan microinfartos con la consecuente necrosis del tejido cardíaco (13).

El cuarto mecanismo se refiere a la presencia de alteraciones en la respuesta inmune.

Experimentalmente, después de la infección por *T. cruzi* se han descrito procesos autoinmunes en contra de diferentes estructuras como son los receptores β adrenérgicos, neuronas, vaina de Schwann y otros componentes cardíacos, que son reconocidos por células T y producen su activación y algunos autores describen propiamente auto-anticuerpos contra estas proteínas, presentes en sueros de pacientes infectados o enfermos (14-16).

Estos mecanismos generados por la presencia del parásito, en forma conjunta desencadenan la fibrosis característica de fase crónica.



Imagen 5- Mecanismos involucrados en el daño miocárdico.

Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas

Cuando *T. cruzi* infecta al huésped mamífero, la respuesta inmune tanto innata como adaptativa es activada para el reconocimiento y defensa contra el parásito. El sistema del complemento es una de las primeras vías de defensa del huésped para controlar la infección; sin embargo, *T. cruzi* presenta proteínas que le permiten la evasión la función del complemento, algunas de las principales son: CRIT, CRP, GP58/68, que son capaces de inhibir a C3 y con ello evitar el correcto ensamblaje del complejo de ataque a la membrana (MAC), lo que permite el ingreso del parásito a las células del vertebrado (17).

En el control de la parasitemia durante el inicio de la infección y fase aguda, participan las células de la respuesta innata, las cuales reconocen glicoproteínas de superficie del parásito por medio de receptores “toll like” (TLR2, TLR3); estos receptores se expresan en diferentes células del huésped, como: macrófagos, NK, granulocitos, eosinófilos o neutrófilos, que activan la vía Myd88 para la expresión de citocinas proinflamatorias y otras funciones de defensa inherentes a estas células (18,19,20).

Este parásito sintetiza transialidasas, las cuales secuestra el ácido siálico de las proteínas de superficie del huésped, lo cual le ayuda a ingresar a la célula por la vía de señalización vesicular, mecanismo que ha sido descrito en los procesos de interiorización al miocardio. El parásito entra a la célula formando una vacuola parasitófora, de la cual saldrá para comenzar el proceso de fisión binaria en el citoplasma. Este proceso se presenta en todas las células nucleadas no pertenecientes a la respuesta inmune, como son los miocardiocitos, neuronas y células de músculo liso; sin embargo, dentro del macrófago, el parásito al ser fagocitado ingresará al fagolisosoma donde será expuesto a especies reactivas de oxígeno para ser destruido; sin embargo, *T. cruzi* expresa enzimas tipo peroxidasas y superóxido dismutasas, las cuáles le permiten evadir a la vía de iNOS dentro del macrófago, y sobrevivir para continuar su ciclo de vida dentro del miocardio (21).

Después de la activación de la respuesta inmune innata, las células dendríticas tendrán la capacidad de presentar antígenos del parásito por medio del complejo mayor de histocompatibilidad, tanto de clase I como de clase II; este proceso activará a los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, los cuales al ser activados de manera intracelular, inician procesos de fosforilación de proteínas intracitoplásmicas que inducen la activación del factor de transcripción nuclear NFκβ, el cual induce la transcripción de citocinas que serán liberadas al microambiente (22).

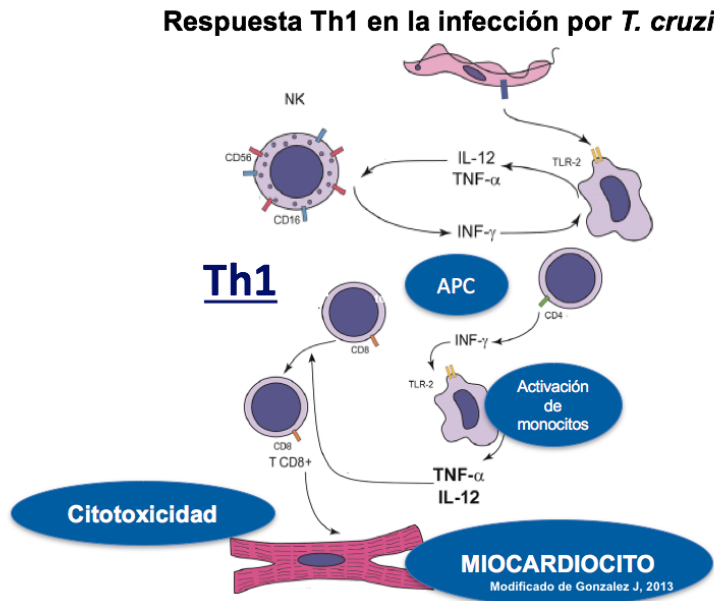


Imagen 6. Respuesta celular implicada en el infiltrado tisular.

Como ya se mencionó el proceso inflamatorio es debido a la acción directa del parásito que inicia desde la fase aguda de la enfermedad, con presencia de infiltrado inflamatorio y producción principalmente de colágena tisular que evoluciona hacia la fibrosis característica del daño crónico (23). Existen además poblaciones de linfocitos efectores que se localizan en diversos tejidos, donde producen citocinas y moléculas citotóxicas. Una vez controlada la infección, los linfocitos T efectores mueren por apoptosis y una pequeña población se convierte en linfocitos T de memoria, que, en caso de ser nuevamente activados por el antígeno, tienen la capacidad de generar nuevos linfocitos T efectores (24). En estudios en pacientes cardiopatas, se ha observado que sus linfocitos TCD4⁺ y CD8⁺ circulantes expresan marcadores de agotamiento y privación de sus funciones efectoras (25, 26); sin embargo, otros autores describen que estas células T circulatorias producen mayor cantidad de citocinas pro inflamatorias como TNF- α (27), y proponen que éstas podrían estar implicadas en la progresión de la cardiopatía chagásica (28).

A nivel tisular, existe poca información acerca de la función de estas células en tejido de pacientes cardiopatas; algunos reportes histológicos muestran un predominio de linfocitos T (29), principalmente TCD4⁺ y CD8⁺ (30). Ambos linfocitos pueden estar implicados en la patogenia tisular, algunos autores describen que los linfocitos CD8⁺ pueden tener procesos de citotoxicidad directa sobre miocardio o por producción de TNF- α que induce la vía de

INOS (31). Por otro lado, Cabral en 2006, señala un mayor número de células infiltrantes positivas para IFN- γ (65-75%) en cortes histológicos de 8 corazones de pacientes fallecidos por miocardiopatía chagásica, sin amastigotes, ni parásitos en sangre (32).

Otros autores mencionan que puede existir pérdida de tolerancia tanto de células T como de B y además se han descrito algunos antígenos parasitarios en el desarrollo de procesos autoinmunes. El mimetismo molecular es un proceso que existe entre antígenos parasitarios y los del huésped y puede contribuir en la patogénesis de la enfermedad; se ha demostrado que algunos antígenos con mimetismo generan clonas de linfocitos T autorreactivas, Cunha Neto describe que tanto T CD4 como T CD8 simultáneamente reconocen miosina cardiaca y la proteína B13 del parásito (33) y Ribeiro-Dos-Santos describe una línea de TCD4⁺ y obtenidas de ratón en fase crónica, que prolifera en respuesta a cualquier antígeno crudo de *T. cruzi* o extractos de tejidos del corazón, provocando miocarditis (34). Cunha-Neto y colaboradores proponen la existencia de poblaciones de linfocitos T capaces de reconocer miosina y que estas células también tienen un incremento en la producción de interferón γ ; por otro lado, en fase crónica también puede desarrollarse debido a hipersensibilidad retardada e inducción de la liberación de citocinas inflamatorias, característico en esta enfermedad.

La pérdida de la tolerancia en los linfocitos T, se debe a un defecto de la regulación a nivel de las selecciones positiva y negativa ya que éstas controlan y regulan correctamente la formación de linfocitos T “naive”; además, se sabe que *T. cruzi* no es capaz de sintetizar ácido siálico, por lo tanto, posee transialidasas, que le permiten transferir a su glicocálix ácido siálico de las superficies de las células del vertebrado. La transialidasa de *Trypanosoma cruzi*, altera la maduración de timocitos generando una mayor migración de células no diferenciadas a circulación, ya que se ha demostrado que se incrementan células doble positivas CD4⁺ CD8⁺ en la infección, además de correlacionar este fenotipo con la severidad de las lesiones (35).

Fibrosis en la enfermedad de Chagas

Los fibroblastos son las células responsables de la producción de proteínas estructurales que conforman la matriz extracelular. La activación de los fibroblastos se induce por diversos estímulos como la lesión tisular y que desencadenan la producción de factores de crecimiento tales como TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), EGF (factor de crecimiento epidérmico) y FCF (factor de crecimiento fibroblástico). Esta activación puede dar lugar a exceso de producción y la deposición de proteínas en la matriz, proceso conocido como fibrosis, con efectos adversos sobre la estructura y la función cardíaca. Además de ser la fuente de colágeno, los fibroblastos producen una serie de citocinas y enzimas como metaloproteinasas de la matriz (MMPs); esta deposición de colágeno y presencia de fibras, interrumpen la conexión entre las células miocárdicas, con compromiso de la integridad estructural y funcional del corazón (36). Cuando se presenta exceso de producción de estas fibras de colágena, se presenta rigidez del miocardio lo que condiciona trastornos en la motilidad parietal, dando lugar a deformación de las cavidades (crecimiento) con la consecuente alteración en las funciones diastólica y sistólica del corazón (37,38,39).

JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia de que la presencia, persistencia del parásito y de antígenos en tejido cardíaco, mantienen un proceso pro-inflamatorio que genera lesiones, las cuales evolucionan desde la fase aguda hasta la crónica (40,41). La fase crónica se caracteriza por la disminución de parasitemia, parasitismo, así como, el incremento en los títulos de anticuerpos del tipo IgG.

Se ha sugerido que la respuesta Th1 del huésped se encuentra desregulada y que esta respuesta podría ser responsable del daño tisular en la fase crónica (42). En la respuesta inmune, el infiltrado inflamatorio y los linfocitos son fundamentales para el control del parásito; sin embargo, su presencia y contribución a la inflamación en tejido de miocardio durante la evolución de la enfermedad no está establecida.

En trabajos previos se ha observado que los pacientes en fase crónica con lesiones severas evidenciadas por historia clínica, electrocardiografía (EGC) y ecocardiografía (ECO) muestran un perfil proinflamatorio Th1/Th17 exacerbado (7,43) el cual puede estar asociado al infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco, sin embargo la histopatología de la lesión no puede ser observada en cortes debido a la invasividad de las biopsias y a pesar de que la patogénesis en la enfermedad de Chagas está siendo ampliamente investigada, existen pocas evidencias de la evolución de las lesiones, ya que la casuística sólo revela casos con patologías severas agudas o crónicas o estudios realizados post-mortem (44), por lo cual a la fecha, no existe una descripción completa y detallada de evolución de la histopatología cardíaca a partir de la primoinfección y su evolución durante las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas en modelo experimental.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue describir y analizar las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas en un modelo experimental, mediante la evaluación de parasitismo, daño fibrótico, presencia y composición del infiltrado celular, para determinar su implicación en la patogénesis de la lesiones tisulares en corazón.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer la infección *T. cruzi* en un modelo in vivo (ratón CD1).

Establecer las fases aguda y crónica en el modelo murino.

En ratones infectados, localizar infiltrado inflamatorio y fibrosis en cortes de corazón (H.E. y Masson).

Fenotipificar por citometría de flujo las células implicadas en el infiltrado inflamatorio CD4 y CD8.

HIPÓTESIS

La evolución de las lesiones histopatológicas en las fases aguda y crónica puede estar asociada al infiltrado linfocitario que se presenta durante la infección.

METODOLOGÍA

Este estudio fue aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética de la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM con clave de FM/DI/022/2017.

Parásito. Se utilizó la cepa Querétaro (Qro.) (ITRI/MX/1986/QRO) caracterizada por su alta virulencia en ratón (45) y que proviene de una región donde se han descrito casos humanos (46). La cepa fue aislada de *Triatoma barberi* en Querétaro en 1986 por personal del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM, y pertenece al cepario del mismo.

Infección en modelo murino. Los ratones se mantuvieron con ciclo de luz y oscuridad (12 horas de luz y 12 horas en la oscuridad), a temperatura ambiente de $23 \pm 1^\circ \text{C}$, con comida y agua *ad libitum*. El empleo y manejo de ratones se apegó en todo momento a las consideraciones éticas señaladas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Se inocularon 80 ratones hembra de 28 g de la cepa CD-1 por vía intraperitoneal (IP); 50 con 1,000 parásitos y 30 control con 100 µL de solución salina estéril (0.9% NaCl). Para las curvas de parasitemia, la muestra de sangre se obtuvo mediante corte en la porción distal de la cola cada 1 vez cada 72 hrs, para cuantificar en cámara de Neubauer con 10 µl de sangre en dilución 1:9 con PBS.

Obtención de sueros. Cada 72 hrs se realizó eutanasia por grupos de 5 animales para obtener sangre por punción cardíaca y después de la formación del coágulo, fue centrifugada a 2500 rpm/15 min, se separó el suero del paquete globular y se glicerizó (v/v) para su conservación en congelación a -45°C hasta el momento de su análisis.

Análisis histopatológico. Para el procesamiento del corazón, después de la eutanasia, se extrajeron los corazones de cinco ratones infectados y 5 controles que fueron perfundidos con PBS y posteriormente con paraformaldehído (4% PFA) y se realizaron cortes sagitales de los ventrículos, los cuales se conservaron en PFA a 4°C hasta su procesamiento. Inicialmente se deshidrataron las muestras, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes con microtomo rotativo de 4 µm de espesor para tinción con las técnicas de Hematoxilina Eosina (H.E.) y tricrómico de Masson.

En los cortes teñidos con H.E se determinó la presencia de nidos de amastigotes y de infiltrado celular. Para determinar la prevalencia de nidos de amastigotes, se observaron al microscopio de luz 100 campos con objetivo de 40X; en los cortes teñidos con Masson, se determinó la ausencia o la presencia uni o multifocal de fibras de colágena.

Clasificación de las lesiones. Con base en las descripciones señaladas Mewton en 2011, inicialmente se definieron los criterios para determinar lesiones fibróticas con la evidencia de fibras finas de colágena con fondo claro, infiltrado y desarreglo y/o destrucción de miocardiocitos adyacentes con extensión de dos o más miocardiocitos; se descartó todo tejido tendinoso, haz de His y endotelios auricular y venoso. Estas lesiones fibróticas se catalogaron como unifocales o multifocales.

Determinación de anticuerpos IgG ante la infección por *Trypanosoma cruzi*.

La detección de IgG anti-*T. cruzi* en suero, se realizó por ELISA indirecta en microplaca de fondo plano de 96 pozos (Costar® 3590), el extracto antigénico Qro y conjugado fueron previamente estandarizados. El Ag se incubó durante 12 hrs a 4°C, se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 20 0.05%, se bloqueó con PBS/leche 5% durante 60 min a T.A.

Los sueros se incubaron (1:100) durante 30 min a 37°C posteriormente se agregó el conjugado (anti-mouse IgG-HRP, Invitrogen ®) en un volumen de 100 µL en dilución 1:3,000 durante 30 min a 37°C; se realizaron 5 lavados, se reveló con el sustrato y el cromógeno (peróxido de hidrógeno en solución tampón de citrato pH 5, OPD). La reacción se detuvo a los 15 min con 100 µL/pozo de ácido sulfúrico 1N. La lectura se realizó en espectrofotómetro de microplaca a 490 nm (D.O.) (Epoch BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.®). El título de corte (*Cut-off*) se calculó con el valor promedio de los resultados de los sueros negativos + 2 o 3 desviaciones estándar (47).

Fotomicrografías. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Olympus® con objetivos de 40X y 100X con una cámara Canon® (EOS Rebel T6i), mediante un adaptador para ocular (Amscope montura T₂).

Citometría de flujo. Se realizó la extracción de linfocitos del tejido cardiaco siguiendo la metodología descrita por Assadian en 2015. Se realizó la tinción intra y extracelular con diversos anticuerpos contra CD3, CD4, CD8 e IFN-γ. Posteriormente en un citómetro (Attune NxT Flow Cytometer) proporcionado por el LabNalCit UNAM se llevó a cabo la adquisición de las muestras, finalmente los datos obtenidos se analizaron con el software FlowJo.

Análisis estadístico. Se realizó análisis de Spearman para comprobar correlación entre las variables estudiadas parasitemia, nidos de amastigotes, presencia de infiltrado, lesiones fibróticas; este análisis considera correlación positiva cuando el valor de r se acerca 1. Así como la fenotipificación de linfocitos por medio graficas de caja y bigote. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism (v6.0 para Windows y GraphPad Software®)

RESULTADOS

Parasitemia y parasitismo

La presencia de parásitos en sangre fue detectable a partir del día 14 posterior a la infección (dpi) con 0.03×10^6 parásitos/mL y el valor máximo a los 30 días con 2.018×10^7 parásitos/mL posteriormente, la parasitemia disminuyó hasta 0 a partir del día 40 dpi. Los nidos de amastigotes en corazón, se detectaron a partir de los 20 dpi y persistieron hasta los 62 dpi. Las variaciones entre los individuos no resultaron significativas como se observa en los promedios mostrados en las Figuras 1a y 1b.

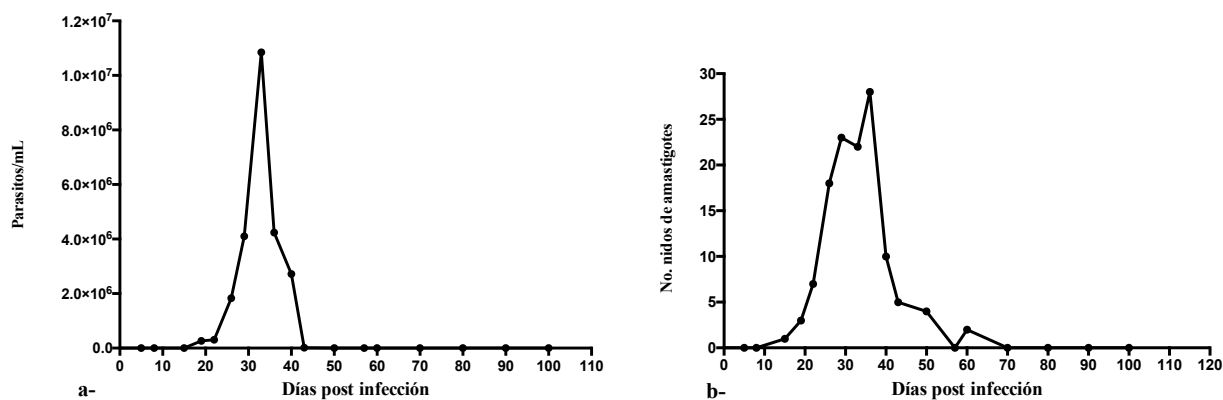


Figura 1. Representación de los valores promedio de parasitemia y parasitismo durante 100 días.

Inóculo: 1000 parásitos/ratón. **A**-Promedio de parásitos/mL de sangre, Kruskal-Wallis ($p=0.9854$). **B**-Promedio de nidos de amastigotes/100 campos (40X), Kruskal-Wallis ($p=0.8766$). $n=50$

Análisis histopatológico

La mayor cantidad de nidos de amastigotes se observaron entre los 30 y 40 dpi, con disminución progresiva hasta el día 62 en que ya no se detectaron. Los nidos se observaron acompañados de fibrosis intersticial reactiva, con la presencia característica de fibras finas de colágena. El infiltrado linfocitario persistió con las lesiones fibróticas y evolucionó hacia fibrosis cicatrizal con reemplazo del miocardio.

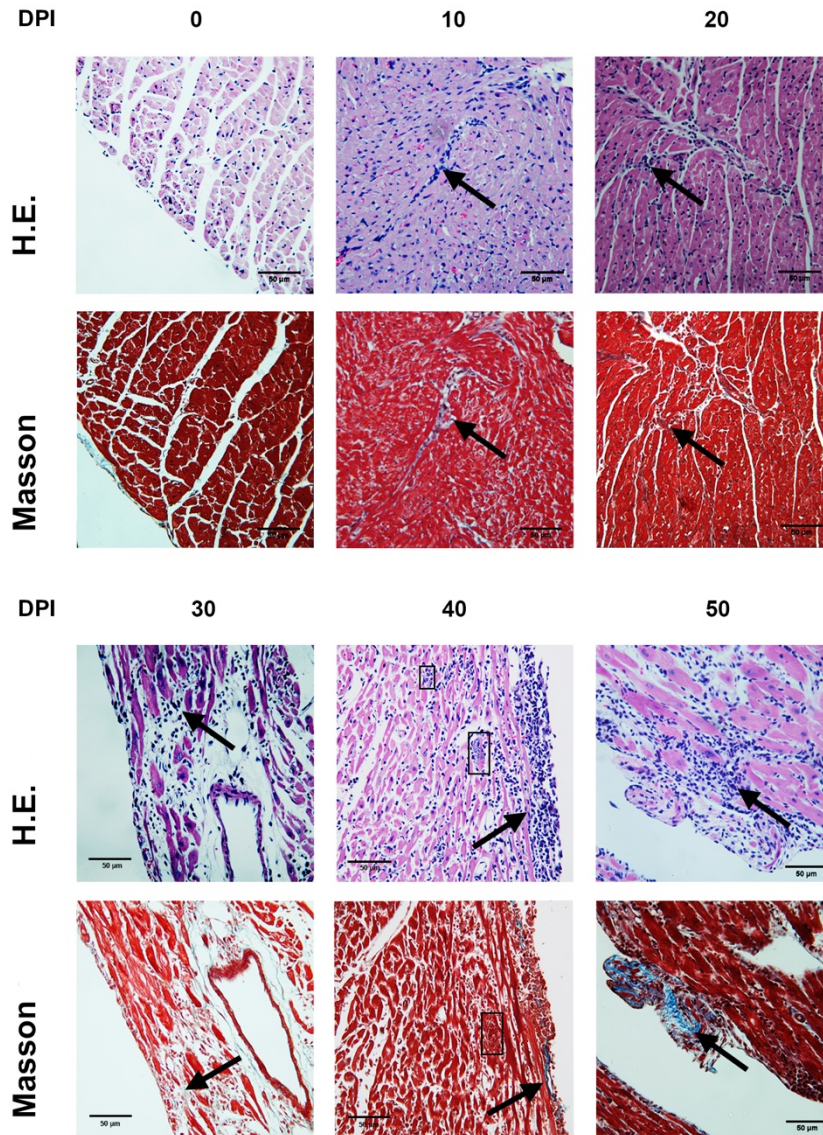


Imagen 1. Fotomicrografías de miocardio de ratón en diferentes tiempos posteriores a la infección. (4000X). A(H.E) B(Masson)

0 dpi: A y B. Sin nidos de amastigotes, sin infiltrado y sin lesiones

10 dpi: A. Infiltrado intersticial principalmente linfocitario (flecha). B. LFI irregulares con escaso infiltrado (flecha).

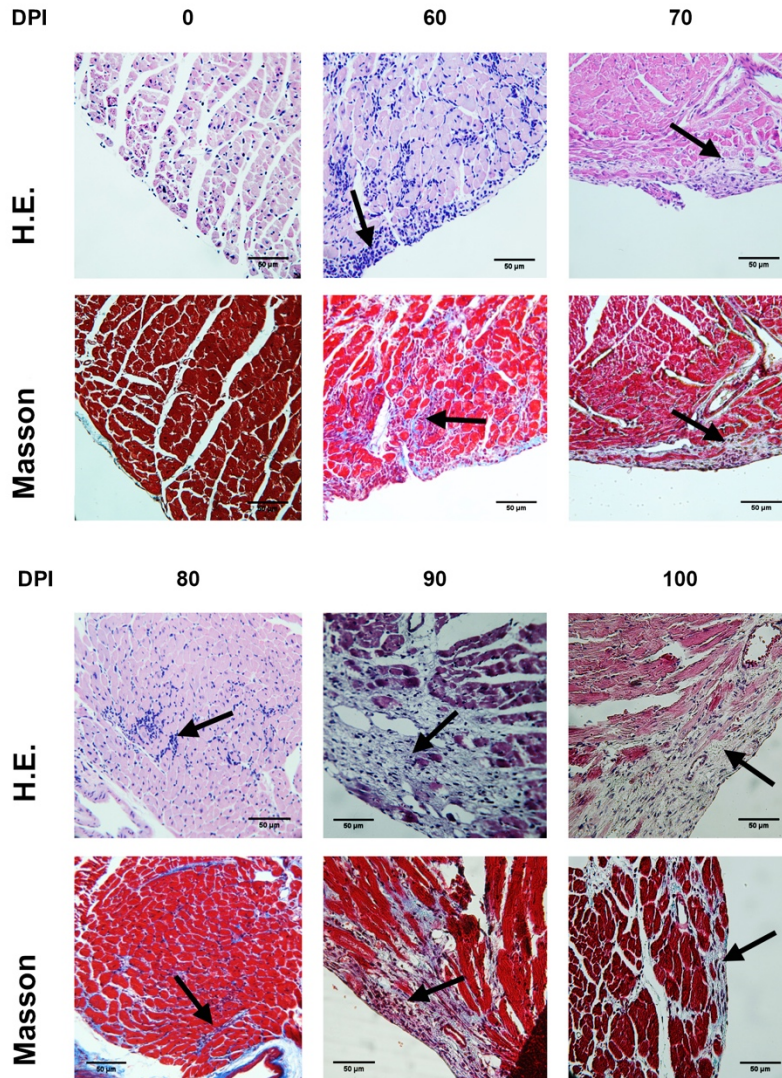
20 dpi: A. Infiltrado intersticial miocárdico y endocárdico principalmente linfocitario (flecha). B. LFI con infiltrado adyacente (flecha).

30 dpi: A. infiltrado intersticial principalmente linfocitario (flecha). B. LFI extensa con infiltrado e intenso desarreglo de fibras (flecha)

40 dpi: A. Infiltrado intersticial linfocitario (flecha). B. Infiltrado linfocitario (flechas) Nidos de amastigotes (cuadrado)

50 dpi: A. Infiltrado intersticial B. LFI extensa con infiltrado e intenso desarreglo de fibras (flechas)

A. Tinción de H.E. B. Tinción de Masson. DPI Días posteriores a la infección. LFI Lesión fibrótica intersticial reactiva.



**Imagen 2. Fotomicrografías de miocardio de ratón en diferentes tiempos posteriores a la infección con *T. cruzi*. (4000X)
A(H.E) B(Masson)**

60 dpi. A. Infiltrado intersticial linfocitario en miocardio (flecha roja) y endocardio (flecha).

70 dpi. A. Infiltrado intersticial linfocitario (flecha). B. LFI extensas con infiltrado linfocitario y desarreglo de fibras (flecha).

80 dpi. A. Infiltrado intersticial B. LFI extensa con infiltrado focalizado (flechas)

90 dpi. A. Infiltrado intersticial linfocitario difuso. B. LFI extensas con infiltrado y desarreglo de fibras (flecha).

100 dpi. A. Infiltrado intersticial linfocitario difuso. B. LF extensas con infiltrado y desarreglo de fibras (flechas) A. Tinción de H.E. B. Tinción de Masson. DPI. Días posteriores a la infección. LF. Lesión fibrótica intersticial reactiva. LFI. Lesión fibrótica intersticial reactiva.

Composición del infiltrado

Durante el tiempo estudiado, se identificaron tres patrones histológicos de infiltrado inflamatorio. El primero, mostró predominio marcado de linfocitos, con muy escasos macrófagos (8-100 dpi); el segundo, denominado mixto, mostró abundantes linfocitos escasos macrófagos y ocasionales neutrófilos (10 y 45 dpi); el tercer patrón mostró exclusivamente linfocitos (46 y 60 dpi). Sobresale la identificación en 6 ratones con conglomerados de células plasmáticas (43 y 60 dpi) (Figura 2).

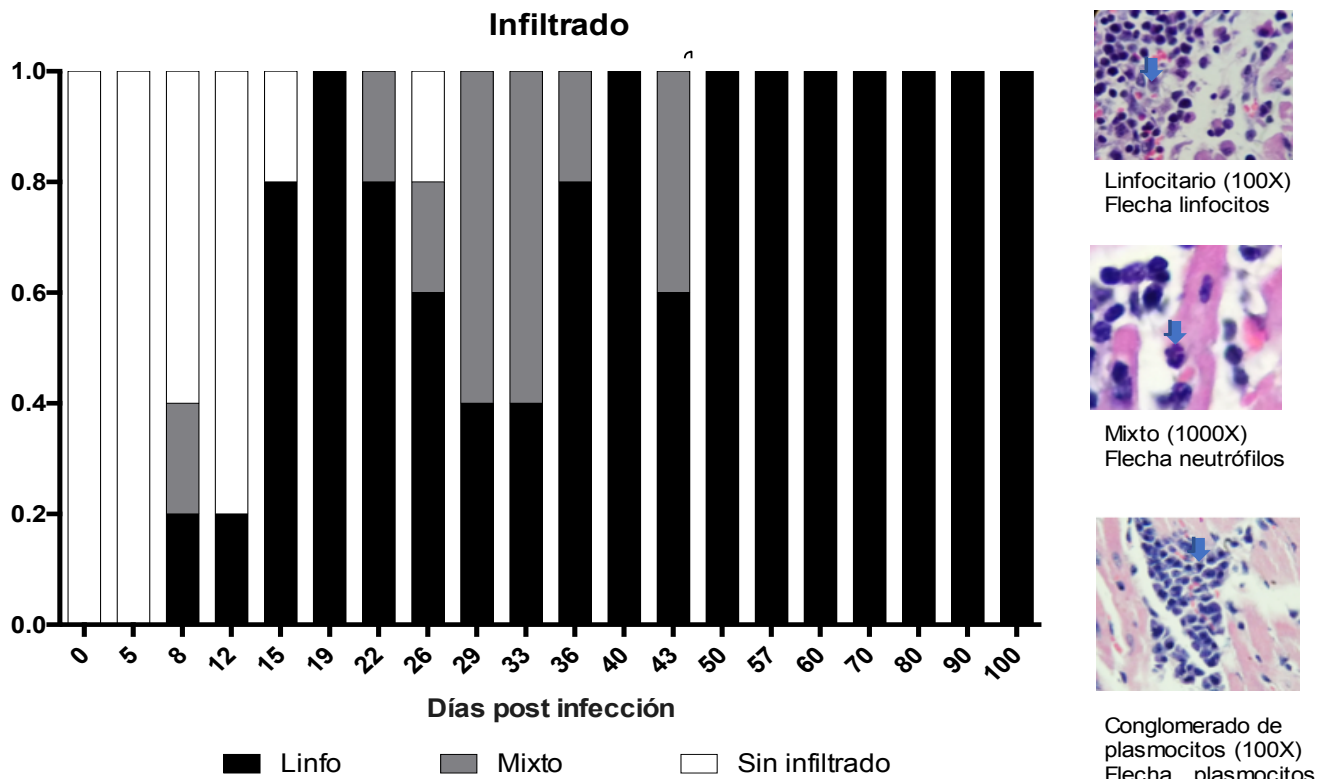


Figura 2. Prevalencia y composición del infiltrado en corazón de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Representación de prevalencia de 5 cortes por tiempo.

Linfo:Infiltrado linfocitario. **Mixto:**Infiltrado de linfocitos con escasos macrófagos y neutrófilos.

*-Escasos plasmocitos.

Localización del infiltrado

El infiltrado celular se localizó predominantemente en miocardio a partir del día 8 con mayor prevalencia entre los 15-29 dpi y en las 3 capas a partir de los 19 dpi con mayor prevalencia a los 60 dpi. Sobresale la identificación de casos con pancarditis (endocarditis, miocarditis y pericarditis) entre los 43-57 dpi y perivasculitis con dilatación capilar en el lapso de 60-100 dpi (Figura 3).

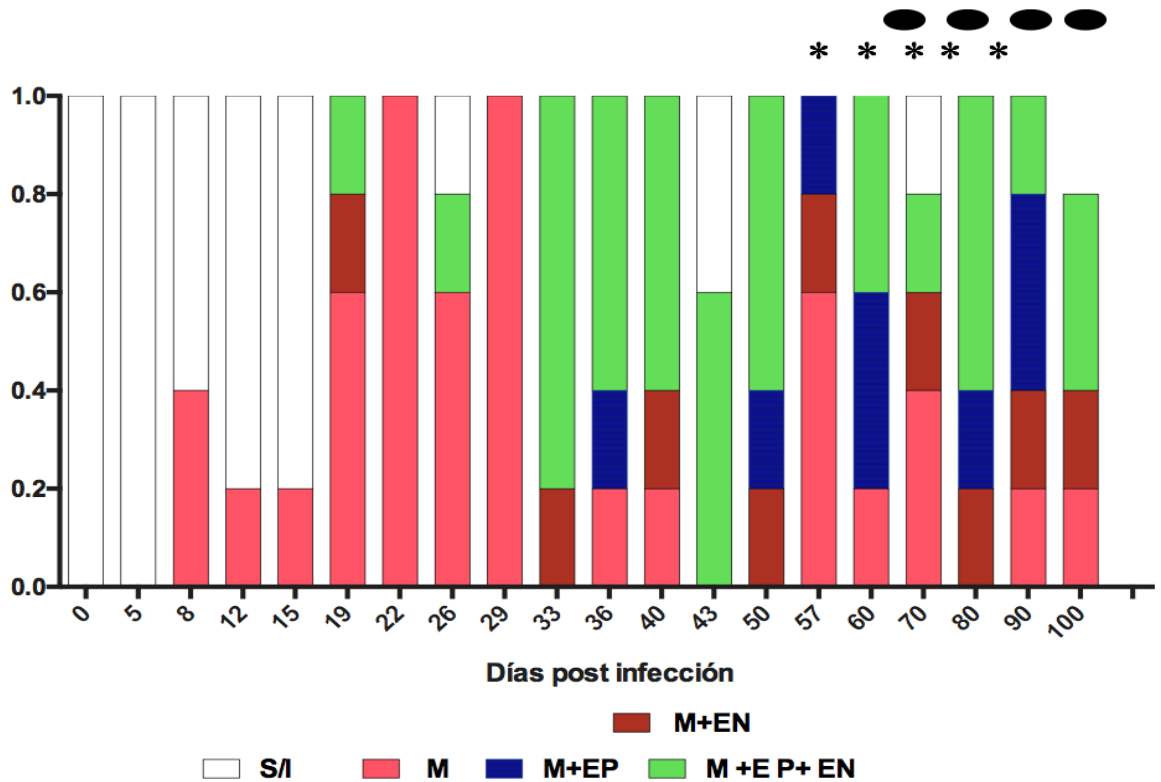


Figura 3. Prevalencia de la localización del infiltrado en las estructuras del corazón.
 S/I: Sin infiltrado. M: miocardio. M+EP: miocardio y epicardio. M+ EN: miocardio y endocardio.
 M+EP+EN: miocardio, epicardio y endocardio.
 *: Pancarditis ●: Capilares dilatados.

Prevalencia del daño fibrótico

El patrón fibrótico unifocal inicia el día 8 con mayor prevalencia entre los 19 y 29 dpi y multifocal con prevalencia entre los 33 y 100 dpi; se observó presencia de miocitolisis entre los días 60 y 100 (Figura 4).

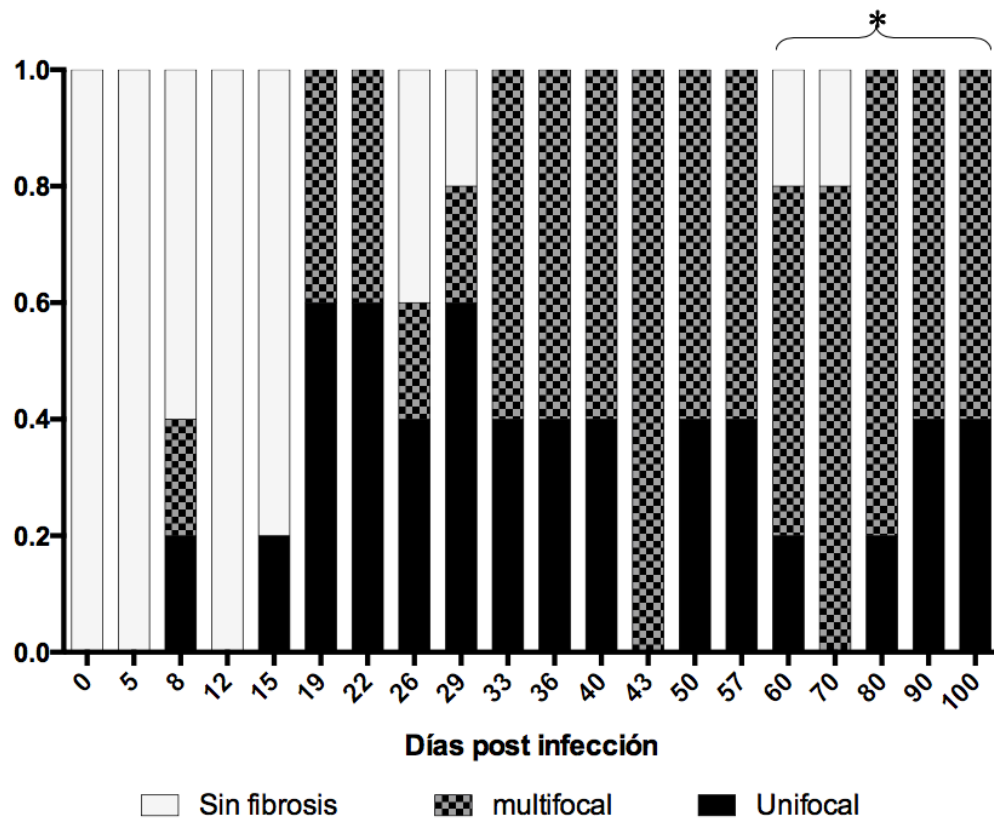


Figura 4. Prevalencia de lesiones fibróticas.

Multifocal: Múltiples focos de lesiones fibróticas acompañados de infiltrado.

Unifocal: Lesión fibrótica única. *: Presencia de miocitolisis.

Determinación de anticuerpos en modelo murino

La detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero mostró seropositividad a partir de los 40 dpi, con incremento progresivo dentro de títulos reactivos hasta el día 90; no se observó reactividad en los sueros de ratones no infectados (Figura 5).

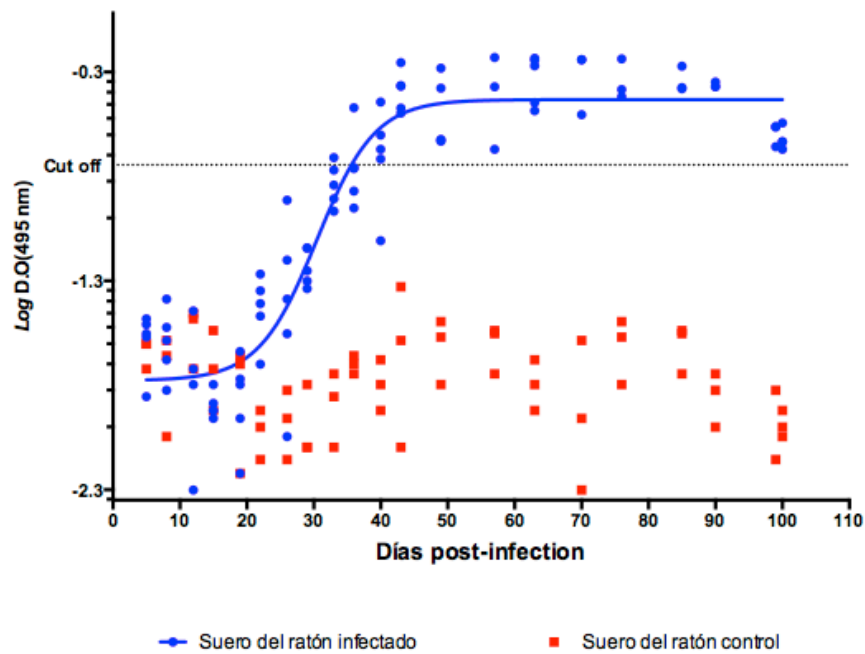


Figura 5- Determinación de IgG anti-*T. cruzi* en el modelo murino.

ELISA indirecta con Ag. Qro. en suero de ratones infectados y controles. Valor de corte: Reactivo: ≥ 0.180 (D.O.).

Correlación entre las variables estudiadas

El análisis de Spearman muestra correlación débil positiva entre la presencia de amastigotes con lesiones fibróticas (Figura 6), positiva entre la presencia de infiltrado y lesiones fibróticas (Figura 7) y fuerte positiva entre el número de nidos de amastigotes y parasitemia (Figura 8).

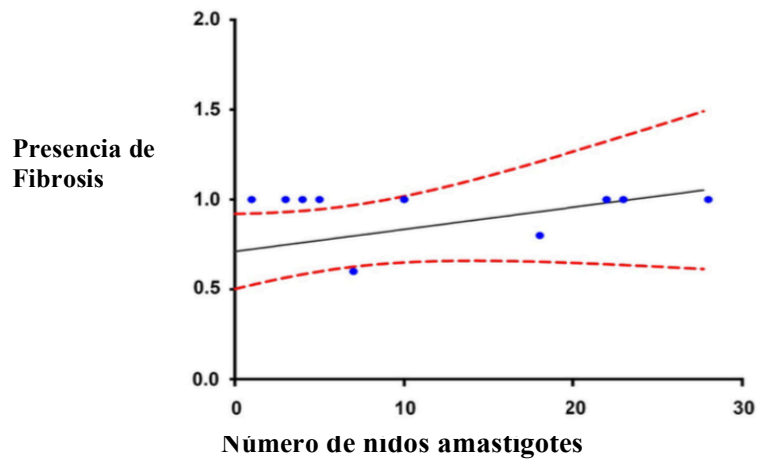


Figura 6: Correlación de nidos de amastigotes y lesiones fibróticas (60 dpi). $r^2 = 0.306$, $P = 0.2027$;

intervalo de confianza es de 95%, Spearman

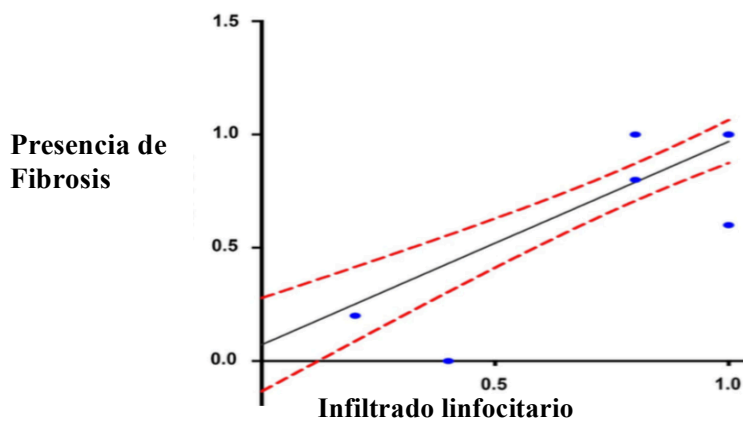
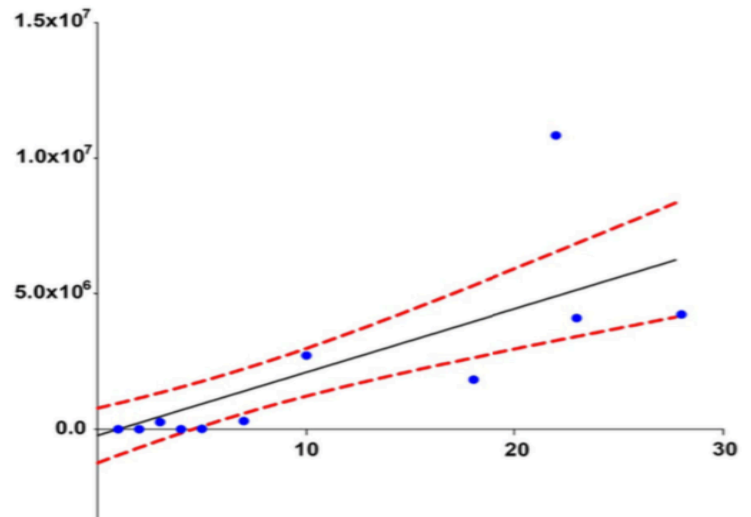


Figura 7. Correlación entre infiltrado y lesiones fibróticas intersticiales reactivas, hasta 100 dpi, $r^2 = 0.899$, $P = 0.001$ 95%, Spearman.

Número de
parásitos /mL



Número de nidos de amastigotes

Figura 8. El coeficiente de correlación de Spearman es $r = 0.930$, con valor de $P < 0.0001$, lo que señala una correlación fuerte y positiva el intervalo de confianza es de 95%, de 0.781 a 0.979.

Fenotipificación de las poblaciones de tejido cardiaco

Durante la fase aguda (1-60 dpi) y crónica (60-100 dpi) de la infección por *T. cruzi*, se realizó el análisis de fenotipificación de las células CD3, CD4 y CD8 y la producción de IFN- γ después del estímulo.

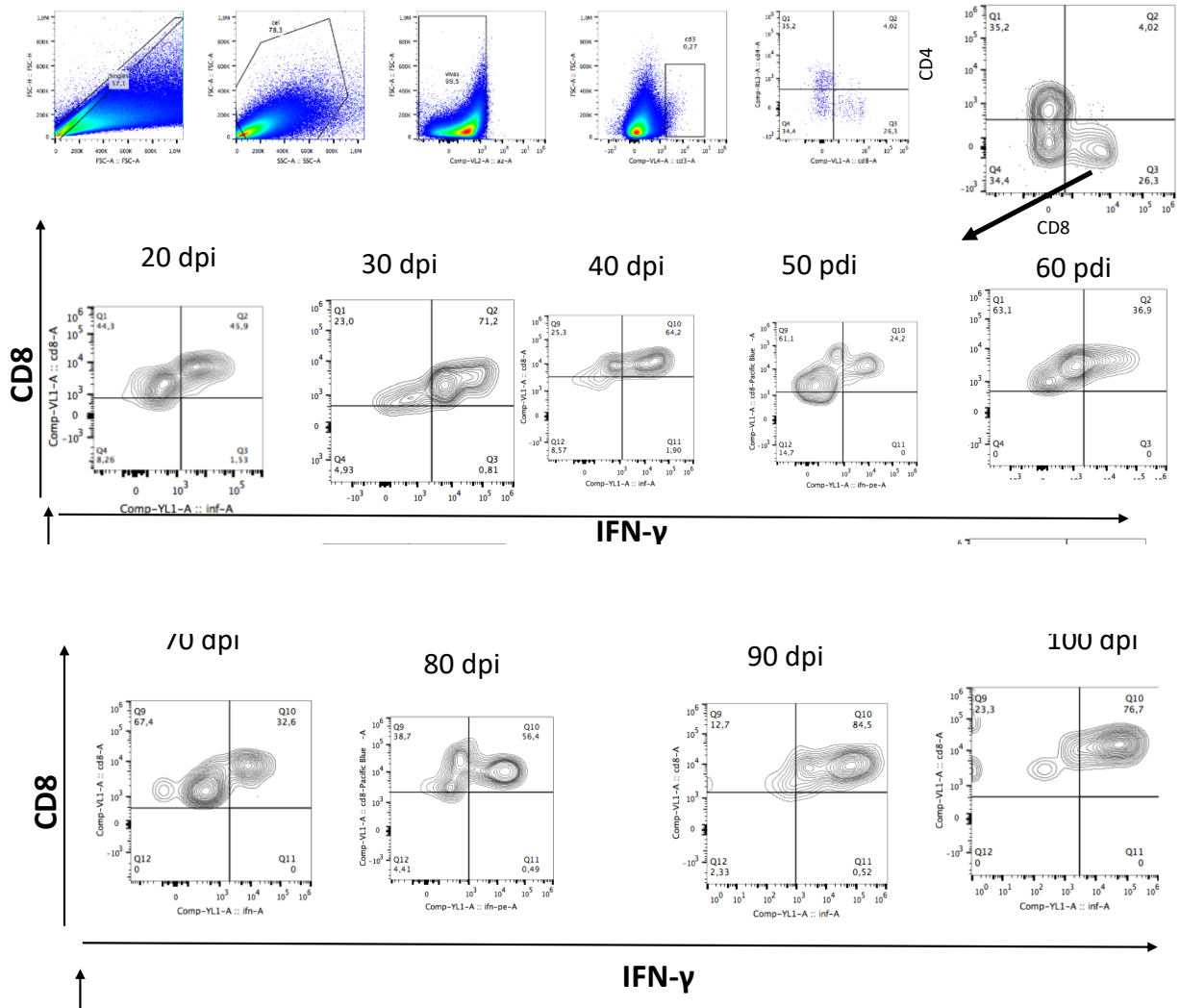


Figura 9. Diagramas de Citometría de Flujo FACS. Se muestra la estrategia seguida para excluir los singletes del análisis, en un nuevo gate se excluye una fracción de células muertas (marcadas con Zombie Aqua) presentes en la población. Posteriormente se observa la ventana que corresponde las células CD3+ fue seleccionado para posteriormente observar las poblaciones CD4+ y CD8+ de las cuales se seleccionaron las poblaciones productoras de IFN- γ .

Análisis estadísticos

En el transcurso de 100 días se observa que la población CD8+ está incrementada en el transcurso de toda la enfermedad, a diferencia de los linfocitos CD4+, CD8+ se incrementa respecto al control y CD4+ disminuye su frecuencia respecto al control.

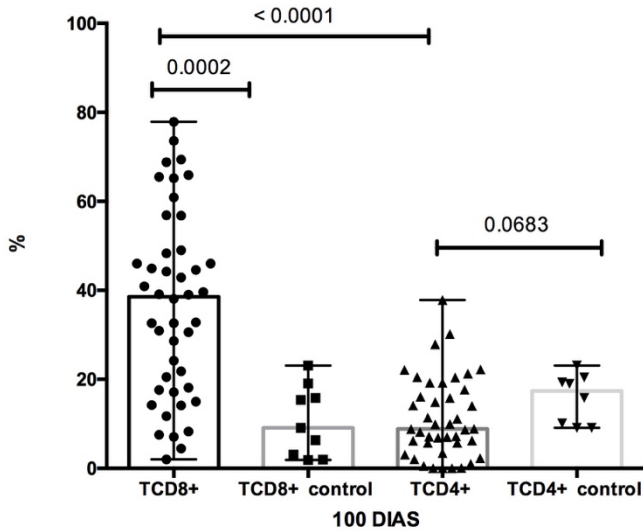


Figura 10. Poblaciones infiltrantes de linfocitos CD4 y CD8 (100 dpi) en tejido cardíaco.

Las células CD8 infiltrantes aumentan su frecuencia respecto al control, y manteniéndose constantes; sin embargo, los CD4 disminuyen su frecuencia respecto al control mostrando una disminución de estas células en el inicio de la fase aguda y aumentando su frecuencia al final de la fase crónica.

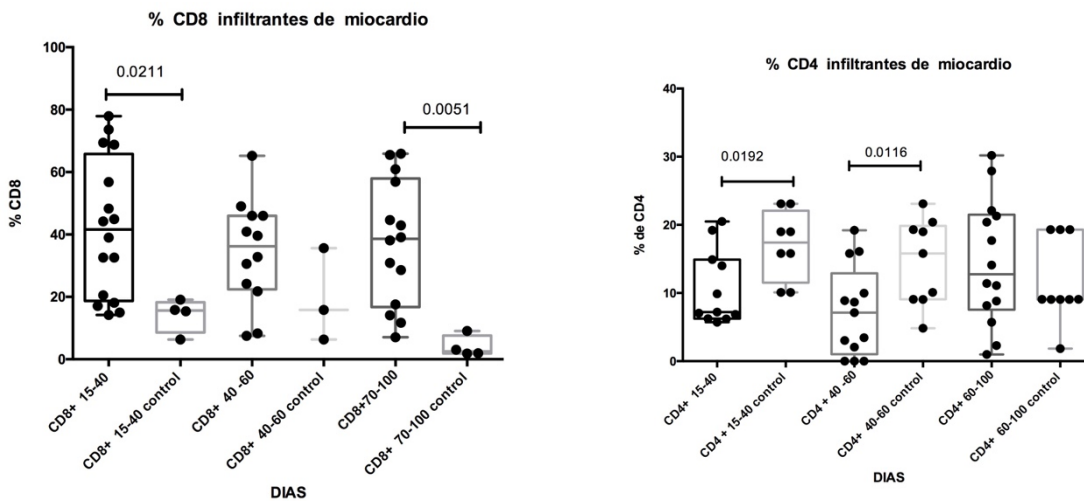


Figura 11. Poblaciones infiltrantes de linfocitos CD4+ y CD8+ por etapa aguda o crónica según corresponda.

Los linfocitos CD8+ productores de IFN- γ están presentes durante la infección por *Trypanosoma cruzi*, aun cuando la parasitemia es nula y el parasitismo escaso o no detectable (60-100 días post-infección).

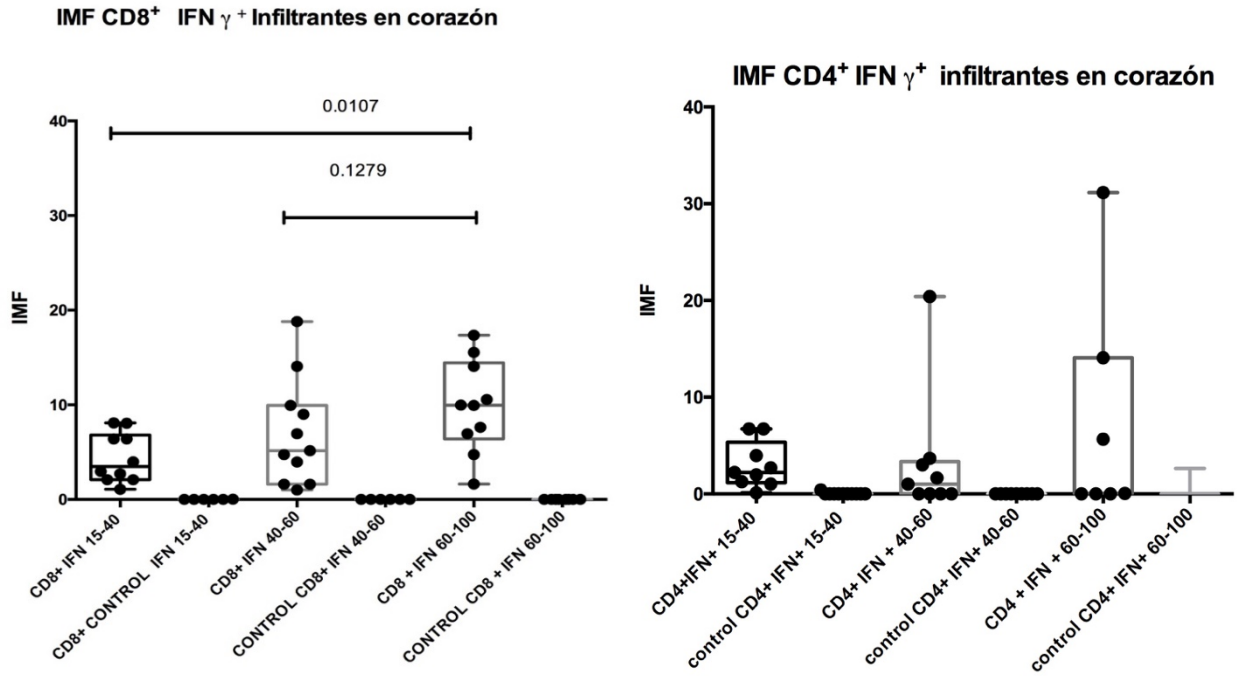


Figura 12. Intensidad media de fluorescencia de CD4 y CD8 productores de interferón gamma por etapa aguda o crónica según corresponda. Se muestra un incremento en la expresión de IFN- γ en la población CD8+ y una constante expresión de IFN- γ por parte de la población CD4+.

DISCUSIÓN

Los estudios en pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi* son limitados debido a la naturaleza de la enfermedad se dificulta el seguimiento de los pacientes y el estudio secuencial de los mecanismos patogénesis de la enfermedad (48), por lo cual es importante estandarizar la infección en modelo murino para poder estudiar histológicamente e inmunológicamente los mecanismos patológicos por los cuales se desarrolla las lesiones en un periodo de tiempo determinado. En este trabajo se logró representar la fase aguda con un inicio de parasitemia a los 15 días y un comportamiento exponencial a los 30 días para finalizar a los 45 días de forma muy similar a lo descrito en humanos, así mismo histológicamente esta fase se desarrolló a partir del día 22 dpi en donde se observó un aumento de la parasitemia a los 40 días para finalizar a los 60 días (Figura 1b), este desfase entre parasitismo y parasitemia es debido al ciclo de vida el parásito dentro del huésped mamífero. Nuestros resultados describen la fase aguda con una duración de 60 días, tiempo similar al descrito en los humanos (60).

Composición del infiltrado

Durante el período de 0-60 días dpi, la composición del infiltrado fue de tipo linfocitario con escasos macrófagos (Figura 2); llama la atención la similitud de estos resultados con lo reportado en el humano, Köberle describe que durante esta fase, se presentan focos inflamatorios con predominio de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos (10). Estas células se involucran en el control de la infección temprana mediante producción de NETS y citocinas (49, 50); en el ratón, estuvieron presentes en los días de mayor parasitemia (29 dpi) (Imagen 1b) y resalta la ausencia de eosinófilos, donde, el infiltrado presente, se caracterizó por ser de predominio linfocitario con escasos macrófagos lo que podría deberse a un proceso de inmunodepresión descrito previamente (51,52); finalmente, en los días 60-100 dpi, destaca la persistencia linfocitaria sin macrófagos, probablemente como lo han referido algunos autores, esta respuesta linfocitaria proinflamatoria constante de tipo Th1 (53) y Th17 contribuye la evolución hacia la cronicidad y al proceso inflamatorio de forma importante (43).

Localización del infiltrado

Este proceso se observó con predominancia en miocardio con escasos focos en endocardio y epicardio (Figura 3); aun cuando el tropismo cardíaco se caracteriza por ser predominantemente en miocardio, algunos autores concuerdan con lo observado en este trabajo ya que al igual que nosotros describen la presencia de focos linfocitarios en pericardio (54) región subendocárdica (55, 56) epicardio y endocardio (días 35-45) (57) en el ratón, nosotros proponemos que lo anterior se debe a que inicialmente la afectación miocárdica de donde se extiende hacia la periferia hacia epicardio y pericardio y en menor grado endocardio (Figuras 2 y 3); a partir de estos resultados, se puede inferir que la presencia y ubicación de focos linfocitarios desencadena la dilatación general del órgano en la cardiopatía crónica (60)(Figura 3).

Prevalencia del daño fibrótico

Durante la fase aguda(1-62 dpi), se destaca la presencia de lesiones fibróticas intersticiales reactivas unifocales (Figura 4) como un mecanismo de reparación constante que probablemente sea el inicio de los procesos de reemplazamiento con fibrosis franca y cicatrización descrita en procesos crónicos (58); entre los 60 y 100 dpi (Figura 4), se observan lesiones multifocales que probablemente correspondan a la lesión crónica descrita previamente en casos humanos (59) donde la fibrosis representa una etapa tardía en el desarrollo de las lesiones durante la cronicidad. En el modelo murino se observó fibrosis extensa hacia el día 100, probablemente cicatrizal lo que favorece el deterioro progresivo de la función lo anterior apoya la ventaja de este modelo para la generación y seguimiento de la fase crónica (Figura 4, Imagen 2, 90 y 100 dpi).

Presencia de Anticuerpos

La fase crónica se caracteriza por una nula o no detectable (por métodos convencionales) presencia parasitaria ya sea en sangre o a nivel tisular (1,60); esto, aunado a la detección de anticuerpos serológicos son marcadores en la evolución clínica de la enfermedad. En este

estudio, la transición entre las fases aguda y crónica se presentó entre los 60 y 70 dpi, al determinar ausencia del parásito tanto en tejido como en circulación por los métodos utilizados; la respuesta humoral es del tipo IgG, que en este estudio se observó a partir de la tercer semana de la primo infección y los mayores títulos de anticuerpos se determinaron entre los 60-70 dpi (Figura 5), momento en que finaliza la fase aguda al relacionarse con la ausencia parasitaria aproximadamente hacia el día 62 dpi y determinar a partir de este momento el inicio de la cronicidad en este modelo.

Correlación entre variables

Respecto a la correlación entre las variables estudiadas, se determina correlación positiva entre la presencia del infiltrado linfocitario en las lesiones fibróticas tanto intersticiales como cicatrizales (Figura 7) a diferencia de la presencia de parásitos con la fibrosis, donde no se encontró fuerte correlación (Figura 6) lo que coincide con otros estudios (54,15); lo anterior es resultado del proceso de fibrosis posterior a la presencia del parásito (Imagen 2, 100 y 90 dpi). Por otro lado, debido a la fuerte correlación entre el infiltrado y las lesiones, se resalta la importancia de estudiar el papel de esta respuesta inflamatoria predominantemente linfocitaria en la patogénesis y evolución de las lesiones en la enfermedad de Chagas (Figura 7).

Finalmente, en otros estudios de nuestro grupo de trabajo, se ha observado en casos humanos lesión cardíaca incipiente en fase crónica en menores de 18 años de edad, con presencia de hipertrofias septales y de pared posterior, probablemente como consecuencia de procesos inflamatorios y fibróticos en miocardio, lo cual lleva al deterioro de la función cardíaca y que en la histopatología en el modelo murino, estas lesiones podrían corresponder a las lesiones referidas como incipientes en los casos humanos en nuestro país (59).

En la imagen 3 se resumen las características de las fases aguda y crónica del modelo estudiado; la fase aguda se caracterizó por presencia de parasitismo y parasitemia acompañado de infiltrado mixto y linfocitario con presencia de fibras de colágena muy finas; en la transición hacia la fase crónica se puede observar la disminución de los nidos de amastigotes, con un aumento de los títulos de IgG. La fase crónica se caracterizó por la presencia de infiltrado linfocitario y lesiones fibróticas extensas con altos títulos de

anticuerpos séricos. Finalmente, durante el análisis histopatológico, se observaron espacios vacuolares que podrían ser producto de los nueve ciclos de división binaria del amastigote que se realizan inmediatamente después de la primoinfección (61,62)

Fenotipificación y presencia de linfocitos infiltrantes de tejido cardiaco.

Debido a la naturaleza de la enfermedad, la mayoría de los modelos animales describen la fase aguda en este modelo se logró establecer la fase aguda y crónica, desde el punto de vista inmunológico que la enfermedad de Chagas tiene un marcado proceso proinflamatorio tipo Th1, acompañado de un aumento de la población de linfocitos, la cual fue principalmente observada desde el inicio de la infección en los infiltrados linfocitarios (Figura 10 y 11). Dentro del infiltrado linfocitario se sabe que células CD8 pueden mediar la protección contra organismos patógenos intracelulares a través de citotoxicidad por granzimas y perforinas (63). Se ha mencionado, anteriormente, que células T CD8 efectoras se definen también como productoras de altas cantidades de IFN- γ . Como se puede observar en la figura 12, existe una permanencia de células productoras de IFN- γ , aún en ausencia de amastigotes o su presencia fue muy escasa. Esto puede corresponder a una permanencia antigénica parasitaria, o bien, a lo referido por otros autores. Algunos antígenos de *T.cruzi* tienen mimetismo molecular con algunas proteínas como la miosina cardiaca. Estos linfocitos CD8+ IFN- γ + podrían contribuir estas respuestas Th1 proinflamatorias aun cuando la parasitemia es nula y el parasitismo es escaso o no detectable (57-133 días post-infección) en etapas más avanzadas de la infección o, lo que referíamos como fase crónica manteniendo esta respuesta que puede contribuir a la cronicidad. En otras patologías cardiacas altos niveles de IFN- γ se asocian con hipertrofia cardiaca, hipertensión, fibrosis y rigidez en el miocardio (63-65). Así mismo, parece que el aumento de CD8+ en frecuencia y producción de interferón (66) y la disminución de CD4+ parecieran ser un componente importante para la evolución de la enfermedad de Chagas.

En la Figura 13 resumen las características de las fases aguda y crónica del modelo estudiado (67); la fase aguda se caracterizó por presencia de parasitismo y parasitemia acompañado de infiltrado mixto y linfocitario con presencia de fibras de colágena muy finas; en la transición hacia la fase crónica se puede observar la disminución de los nidos de amastigotes, con un

aumento de los títulos de IgG. La fase crónica se caracterizó por la presencia de infiltrado linfocitario y lesiones fibróticas extensas con altos títulos de anticuerpos séricos.

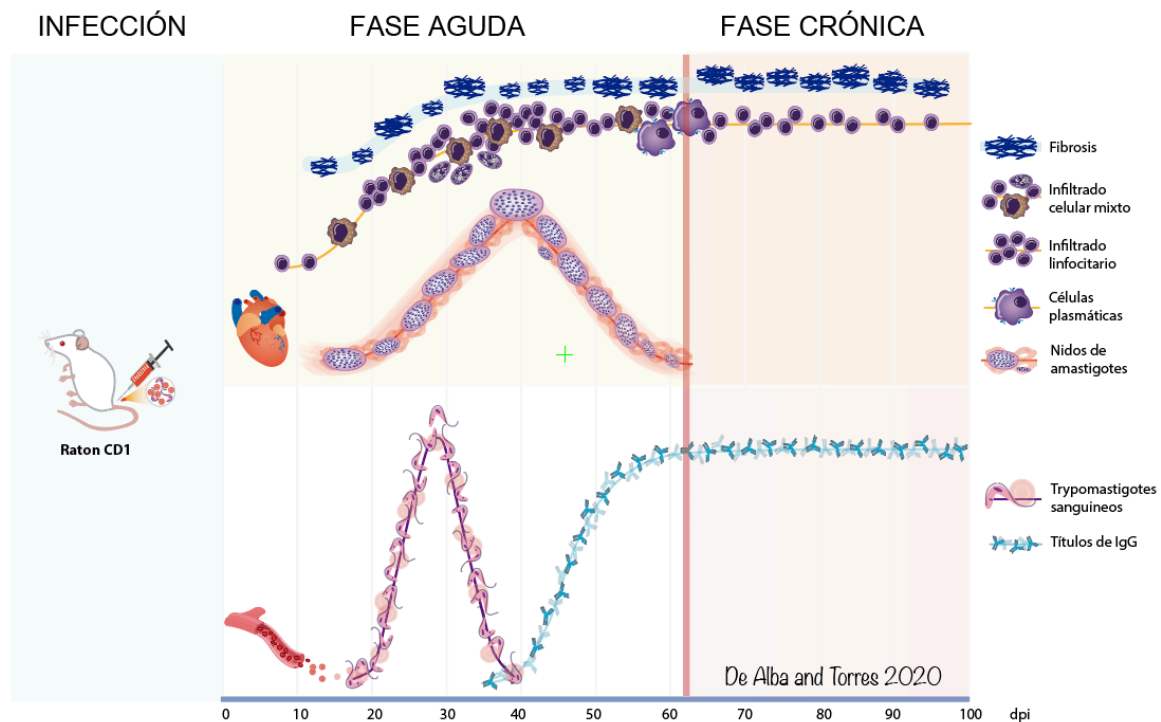


Figura 13. Representación gráfica de las variables estudiadas durante la progresión de la patogénesis de la enfermedad de Chagas en modelo murino.

CONCLUSIONES

- El modelo utilizado determina que la fase aguda presenta una duración de 62 días y la fase crónica se presenta a partir del día 63.
- La presencia del daño fibrótico es constante desde la fase aguda y sugiere progresión a partir de la infección.
- El infiltrado linfocitario está relacionado con la presencia de daño fibrótico.
- Durante el transcurso de la enfermedad, la presencia y permanencia de linfocitos CD8+ productores de IFN- γ y la disminución de la población CD4+ pueden ser factores asociados a la progresión y daño del tejido cardíaco.
- El modelo murino es un modelo adecuado para estudiar la enfermedad de Chagas debido a que se comporta en forma similar al humano.

PERSPECTIVAS

- Continuar con el análisis fenotípico de los linfocitos infiltrantes.
- Realizar análisis del perfil de citocinas Th1/Th17 expresadas en el ambiente proinflamatorio local.
- Ampliar el análisis histopatológico de 100 a 200 dpi.
- Realizar en tejido cardíaco el marcaje de los fenotipos encontrados mediante inmunohistoquímica
- Analizar mediante Western blot, el patrón de componentes inmuno dominantes por fase clínica en este modelo experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159–218. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761909000200008>
2. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. (2018).
3. 62ª Asamblea Mundial de la Salud. Punto 12.12, Orden del Día Provisional, 20 de marzo de 2009. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. OMS/A62/17/2009.
4. . Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., & Kirk, P. M. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
5. UNAM, SSA, OPS. Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. México D.F.2006; 45 p.
6. Salazar-Schettino, P, Bravo, M, Torres, M, & Arteaga, I.(2011) *Diagnóstico Morfológico de la Parasitosis*.(3rd ed).México:Editorial Mendez.
7. Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., Alba-Alvarado, M. C. de, Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medina, J., Fernández-Santos, N. A., & Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en Mexico. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 45(2), 84–92

8. Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T., & Silva, J. S. (2002). Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology*, 18(6), 262–265. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02283-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02283-3)
9. Jones, E. M., Colley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L., & McCurley, T. L. (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(3), 348–357. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.348>.
10. Köberle, F. (1968). Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. *Advances in Parasitology*, 6(C), 63–116. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60472-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60472-8)
11. KIERSZENBAUM, F., & BUDZKO, D. B. (1982). *Trypanosoma cruzi*: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells. *Parasite Immunology*, 4(6), 441–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1982.tb00455.x>
12. Nunes, M. C. P., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., Dutra, W. O., Gascon, J., Morillo, C. A., Oliveira-Filho, J., Ribeiro, A. L. P., & Marin-Neto, J. A. (2018). Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 138(12), e169–e209. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000599>
13. Herrera, R. N., Díaz, E., Pérez, R., Chaín, S., Sant-Yacumo, R., Rodríguez, E., Bianchi, J., Coviello, A., Miotti, J., Flores, I., de la Serna, F., Muntaner, J., Berman, S., & Luciardí, H. (2003). Estado protrombótico en estadios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica. *Revista Espanola de Cardiologia*, 56(4), 377–382. <https://doi.org/10.1157/13045653>
14. Teixeira, A. R., Figueiredo, F., & Rezende Filho, J. (1995). Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigen. II--Use of the skin test with T12E antigen for the diagnosis of Chagas disease. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28(3), 259–265. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821995000300015>
15. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* (Vol. 115, Issue 9, pp. 1109–1123). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>
16. Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>

17. . Ramírez-Tolosa G, Ferreira A Trypanosoma cruzi Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host/Parasite Molecules and Trypanosoma cruzi Calreticulin. *Frontiers in microbiology*, 8, 1667. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>
18. Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D. C., Melo, M. B., Ropert, C., Rodrigues, M. M., & Gazzinelli, R. T. (2010). The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert reviews in molecular medicine*, 12, e29. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001560>
19. Oliveira, A. C., Peixoto, J. R., de Arruda, L. B., Campos, M. A., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T., Akira, S., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Nobrega, A., & Bellio, M. (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(9), 5688–5696. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5688>
20. Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procópio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., & Gazzinelli, R. T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of immunology*. 167(1), 416–423. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>
21. Stempin, C., Giordanengo, L., Gea, S., & Cerbán, F. (2002). Alternative activation and increase of Trypanosoma cruzi survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *Journal of leukocyte biology*, 72(4), 727–734.
22. Laidlaw, B. J., Craft, J. E., & Kaech, S. M. (2016). The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nature reviews. Immunology*, 16(2), 102–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.10>
23. Tafuri, W. L. (1999). Immunopathology of Chagas Disease - A Historical Overview. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(SUPPL. 1), 247–248. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700040>
24. Mahler, E., Sepulveda, P., Jeannequin, O., Liegeard, P., Gounon, P., Wallukat, G., Eftekhari, P., Levin, M. J., Hoebeke, J., & Hontebeyrie, M. (2001). A monoclonal antibody against the immunodominant epitope of the ribosomal P2beta protein of Trypanosoma cruzi interacts with the human beta 1-adrenergic receptor. *European journal of immunology*, 31(7), 2210–2216. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200107\)31:7<2210::aid-immu2210>3.0.co;2-jJ](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7<2210::aid-immu2210>3.0.co;2-jJ)
25. Lasso, P., Mateus, J., Pavía, P., Rosas, F., Roa, N., Thomas, M. C., López, M. C., González, J. M., Puerta, C. J., & Cuéllar, A. (2015). Inhibitory

Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Linked to Functional Responses against *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic Chagasic Patients. *Journal of immunology*, 195(8), 3748–3758. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500459>

26. Mateus, J., Pérez-Antón, E., Lasso, P., Egui, A., Roa, N., Carrilero, B., González, J. M., Thomas, M. C., Puerta, C. J., López, M. C., & Cuéllar, A. (2017). Antiparasitic Treatment Induces an Improved CD8⁺ T Cell Response in Chronic Chagasic Patients. *Journal of immunology*, 198(8), 3170–3180. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602095>

27. Talvani, A., Rocha, M. O., Barcelos, L. S., Gomes, Y. M., Ribeiro, A. L., & Teixeira, M. M. (2004). Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(7), 943–950. <https://doi.org/10.1086/381892>

28. Sousa, G. R., Gomes, J. A., Fares, R. C., Damásio, M. P., Chaves, A. T., Ferreira, K. S., Nunes, M. C., Medeiros, N. I., Valente, V. A., Corrêa-Oliveira, R., & Rocha, M. O. (2014). Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PloS one*, 9(3), e87082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087082>

29. Milei, J., Fernández Alonso, G., Vanzulli, S., Storino, R., Matturri, L., & Rossi, L. (1996). Myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic cardiomyopathy: Immunohistochemical findings. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 5(4), 209–219. [https://doi.org/10.1016/1054-8807\(96\)00006-3](https://doi.org/10.1016/1054-8807(96)00006-3)

30. Benvenuti, L. A., Higuchi, M. L., & Reis, M. M. (2000). Upregulation of adhesion molecules and class I HLA in the myocardium of chronic chagasic cardiomyopathy and heart allograft rejection, but not in dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 9(2), 111–117. [https://doi.org/10.1016/s1054-8807\(00\)00027-2](https://doi.org/10.1016/s1054-8807(00)00027-2)

31. Silverio, J. C., Pereira, I. R., Cipitelli, M., Vinagre, N. F., Rodrigues, M. M., Gazzinelli, R. T., & Lannes-Vieira, J. (2012). CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002645. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002645>

32. Cabral, H. R., Novak, I. T., Glocker, T. M., & Castro Viera, G. (2006). Interferon gamma production by PAS-positive T lymphocytes of chagasic patients infiltrated into human hearts in the sites of lesions. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas*, 63(3), 47–52.

33. Cunha-Neto, E., Coelho, V., Guilherme, L., Fiorelli, A., Stolf, N., & Kalil, J. (1996). Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *The Journal of clinical investigation*, 98(8), 1709–1712. <https://doi.org/10.1172/JCI118969>
34. Ribeiro--dos-Santos, R., Pirmez, C., & Savino, W. (1991). Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. *Research in immunology*, 142(2), 134–137. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(91\)90023-c](https://doi.org/10.1016/0923-2494(91)90023-c)
35. Pérez, A. R., Morrot, A., Berbert, L. R., Terra-Granado, E., & Savino, W. (2012). Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1262, 27–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06627.x>
36. Calvet, C. M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M. N., & Pereira, M. C. (2004). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Experimental parasitology*, 107(1-2), 20–30.
37. Andrade SG, Grimaud JA. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi*--an ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 Jan-Mar;81(1):29-41. doi: 10.1590/s0074-02761986000100004. PMID: 3540527
38. Marino, A. P., Silva, A. A., Pinho, R. T., & Lannes-Vieira, J. (2003). *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 36(8), 1121–1133. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003000800020>
39. Higuchi, M. L., Fukasawa, S., De Brito, T., Parzianello, L. C., Bellotti, G., & Ramires, J. A. (1999). Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart (British Cardiac Society)*, 82(3), 279–285. <https://doi.org/10.1136/hrt.82.3.279>
40. Teixeira, A. R., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>

41. Savino, W., Villa-Verde, D. M., Mendes-da-Cruz, D. A., Silva-Monteiro, E., Perez, A. R., Aoki, M., Bottasso, O., Guiñazú, N., Silva-Barbosa, S. D., & Gea, S. (2007). Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine & growth factor reviews*, *18*(1-2), 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.01.010>
42. Albareda, M. C., Laucella, S. A., Alvarez, M. G., Armenti, A. H., Bertochi, G., Tarleton, R. L., & Postan, M. (2006). *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *International immunology*, *18*(3), 465–471. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh387>
43. De Alba-Alvarado, M., Salazar-Schettino, P. M., Jiménez-Álvarez, L., Cabrera-Bravo, M., García-Sancho, C., Zenteno, E., Vazquez-Antona, C., Cruz-Lagunas, A., Zúñiga, J., & Bucio-Torres, M. I. (2018). Th-17 cytokines are associated with severity of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in pediatric patients from endemic areas of Mexico. *Acta tropica*, *178*, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.009>
44. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, *115*(9), 1109–1123. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>
45. Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L., & Martínez, I. (2010). Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2010*, 890672. <https://doi.org/10.1155/2010/890672>
46. De Haro, I. 1997. Enfermedad de Chagas en una comunidad del altiplano mexicano. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. UNAM.
47. Cura EN, Wendel S. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. OPS (1994)
48. Mateus, J., Guerrero, P., Lasso, P., Cuervo, C., González, J. M., Puerta, C. J., & Cuéllar, A. (2019). An Animal Model of Acute and Chronic Chagas Disease With the Reticulotropic Y Strain of *Trypanosoma cruzi* That Depicts the Multifunctionality and Dysfunctionality of T Cells. *Frontiers in immunology*, *10*, 918. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00918>
49. Chen, L., Watanabe, T., Watanabe, H., & Sendo, F. (2001). Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *European journal of immunology*, *31*(1), 265–275. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200101\)31:1<265::AID-IMMU265>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200101)31:1<265::AID-IMMU265>3.0.CO;2-L)

50. Sousa-Rocha, D., Thomaz-Tobias, M., Diniz, L. F., Souza, P. S., Pinge-Filho, P., & Toledo, K. A. (2015). Trypanosoma cruzi and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS one*, *10*(10), e0139569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.013956>
51. Kierszenbaum, F., & Budzko, D. B. (1982). Trypanosoma cruzi: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells. *Parasite immunology*, *4*(6), 441–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1982.tb00455.x>
52. Gomes, J. A., Campi-Azevedo, A. C., Teixeira-Carvalho, A., Silveira-Lemos, D., Vitelli-Avelar, D., Sathler-Avelar, R., Peruhype-Magalhães, V., Silvestre, K. F., Batista, M. A., Schachnik, N. C., Correa-Oliveira, R., Eloi-Santos, S., & Martins-Filho, O. A. (2012). Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology*, *217*(10), 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.01.014>
53. Cardoni, R. L., Antúnez, M. I., & Abrami, A. A. (1999). Respuesta TH1 en la infección experimental con Trypanosoma cruzi. *Medicina*, *59* Suppl 2, 84–90.
54. Schettino, P. M., Tay, J., Navarrete, F., & Ramos, S. (1975). Comportamiento en el ratón de una cepa mexicana de Trypanosoma cruzi de peculiar virulencia. *Revista de investigacion en salud publica*, *35*(1), 37–45.
55. Pizzi P, T., Wallace R, A., Villagra O, R., Muñoz V, S., Ortiz Z, S., & Solari I, A. (2005). Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de Trypanosoma cruzi de Chile. *Revista médica de Chile*, *133*(4), 432–438. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872005000400006>
56. Higuchi, M., Benvenuti, L. A., Martins Reis, M., & Metzger, M. (2003). Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular research*, *60*(1), 96–107. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00361-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00361-4)
57. Torres, C. Magarinos. (1941). Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *36*(3), 391-404. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761941000300015CM>.
58. Mewton, N., Liu, C. Y., Croisille, P., Bluemke, D., & Lima, J. A. (2011). Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *Journal of the American College of Cardiology*, *57*(8), 891–903. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.013>

59. Salazar-Schettino, P. M., Cabrera-Bravo, M., Vazquez-Antona, C., Zenteno, E., Alba-Alvarado, M., Gutierrez, E. T., Gomez, Y. G., Perera-Salazar, M. G., Torre, G. G., & Bucio-Torres, M. I. (2016). Chagas Disease in Mexico: Report of 14 Cases of Chagasic Cardiomyopathy in Children. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 240(3), 243–249. <https://doi.org/10.1620/tjem.240.243>
60. Viotti, R & Vigliano, C. 2015 *Enfermedad de Chagas: un enfoque práctico basado en la investigación médica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
61. Dvorak, J. A., & Hyde, T. P. (1973). Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Experimental parasitology*, 34(2), 268–283. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(73\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(73)90087-8)
62. Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature reviews. Microbiology*, 3(10), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>.
63. Martin D., & Tarleton, R. (2004). Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Immunological reviews*, 201, 304–317. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00183.x>
64. Levick, S. P., & Goldspink, P. H. (2014). Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure?. *Heart failure reviews*, 19(2), 227–236. <https://doi.org/10.1007/s10741-013-9393-8>
65. Bonney, K. M., & Engman, D. M. (2015). Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *The American journal of pathology*, 185(6), 1537–1547. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023>
66. González, J, Azzato, F, Ambrosio, G & Milei, J.(2013). *Pathogenesis of Chronic Chagasic Myocarditis*, Diagnosis and Treatment of Myocarditis, IntechOpen, DOI: 10.5772/55387.
67. De Alba-Alvarado, M., Bucio-Torres, M. I., Zenteno, E., Sampedro-Carrillo, E., Hernández-Lopez, M., Reynoso-Ducoing, O., Torres-Gutiérrez, E., Guevara-Gomez, Y., Guerrero-Alquicira, R., Cabrera-Bravo, M., & Salazar-Schettino, P. M. (2020). Response to Infection by Trypanosoma cruzi in a Murine Model. *Frontiers in veterinary science*, 7, 568745. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568745>

ANEXO

(artículo requisito para la obtención del grado)



Response to Infection by *Trypanosoma cruzi* in a Murine Model

Mariana De Alba-Alvarado¹, Martha Irene Bucio-Torres¹, Edgar Zenteno², Enrique Sampedro-Carrillo³, Mariana Hernández-Lopez¹, Olivia Reynoso-Ducoing¹, Elia Torres-Gutiérrez¹, Yolanda Guevara-Gomez¹, Raquel Guerrero-Alquicira³, Margarita Cabrera-Bravo^{1*} and Paz María Salazar-Schettino^{1*}

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³ Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Jesus Hernandez,
Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología (CONACYT), Mexico

Reviewed by:

Faten A. Okda,
St. Jude Children's Research Hospital,
United States
Gladys Antonieta Rojas-de-Arias,
Center for the Development of
Scientific Research (CEDIC), Paraguay

*Correspondence:

Paz María Salazar-Schettino
pazmar@unam.mx
Margarita Cabrera-Bravo
imay@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Veterinary Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 02 June 2020

Accepted: 31 August 2020

Published: 06 October 2020

Citation:

De Alba-Alvarado M, Bucio-Torres MI,
Zenteno E, Sampedro-Carrillo E,
Hernández-Lopez M,
Reynoso-Ducoing O,
Torres-Gutiérrez E, Guevara-Gomez Y,
Guerrero-Alquicira R,
Cabrera-Bravo M and
Salazar-Schettino PM (2020)
Response to Infection by
Trypanosoma cruzi in a Murine Model.
Front. Vet. Sci. 7:568745.
doi: 10.3389/fvets.2020.568745

Cardiopathy is a common, irreversible manifestation of the chronic phase of Chagas disease; however, there is controversy as to how the causes for progression from the acute to the chronic phase are defined. In this work, the presence of the parasite is correlated with the occurrence of cell infiltration and fibrosis in cardiac tissues, as well as IgG detection and disease progression in a murine model. Fifty CD1 mice were infected intraperitoneally with *Trypanosoma cruzi*, while 30 control were administered with saline solution. Parasitemia levels were determined, and IgG titers were quantified by ELISA. At different times, randomly selected mice were euthanized, and the heart was recovered. Cardiac tissue slides were stained with HE and Masson trichrome stain. A significant increase in parasitemia levels was observed after 15 days post-infection (dpi), with a maximum of 4.1×10^6 parasites on 33 dpi, ending on 43 dpi; amastigote nests were observed on 15–62 dpi. Histological analysis revealed lymphocytic infiltration and fibrotic lesions from 8 dpi until the end of the study, on 100 dpi. The presence of plasma cells in the myocardium observed on 40–60 dpi, accompanied by seropositivity to ELISA on 40–100 dpi, was regarded as the hallmark of the transition phase. Meanwhile, the chronic phase, characterized by the absence of amastigotes, presence of cell infiltration, fibrotic lesions, and seropositivity, started on 62 dpi. A strong correlation between parasitemia and the presence of amastigote nests was found ($r^2 = 0.930$), while correlation between the presence of fibrosis and of amastigote nests was weak ($r^2 = 0.306$), and that between fibrosis and lymphocyte infiltration on 100 dpi was strong ($r^2 = 0.899$). The murine model is suitable to study Chagas disease, since it can reproduce the chronic and acute phases of the human disease. The acute phase was determined to occur on 1–60 dpi, while the chronic phase starts on 62 dpi, and fibrotic damage is a consequence of the continuous inflammatory infiltration; on the other hand, fibrosis was determined to start on the acute phase, being more apparent in the chronic phase, when Chagas disease-related cardiopathy is induced.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, cardiopathy, murine model, histopathology

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease (1). It is regarded as a zoonanthroponosis since it involves infections that require the interaction of arthropod vectors and mammal hosts, including humans. In Latin America, Chagas disease is a major public health, with prevalence rates that vary from one country to another. Two clinical phases have been described for the disease: an acute phase, which is either asymptomatic or shows unspecific symptoms and signs, and a chronic phase, the most severe manifestation of which is cardiopathy. Cardiopathic parasite strains are prevalent in Mexico (2, 3).

The inflammatory process affecting the heart in the acute phase of Chagas disease has been described as due to a direct action of the parasite, whose multiplication inside myocardial cells damages them, causing cell infiltration. The lesions evolve into fibrosis, with collagen production in chronically damaged tissue (4). An association has been reported between the number of amastigote nests in the myocardium and high parasitemia levels for various *T. cruzi* strains (5). There is evidence that the presence and persistence of parasite antigens in myocardial tissues sustain a proinflammatory process, which in turn causes lesions that progress into chronic cardiopathy (6–10).

The chronic phase of Chagas disease is characterized by decreased levels of parasitemia and cardiac parasitism, and increased titers of IgG antibodies. There is evidence that the host's immunoregulatory response is altered, and this could be responsible for tissue damage in the chronic phase (6, 11). Previous works have shown that chronic phase patients with severe lesions on echocardiography (ECHO) show an exacerbate proinflammatory Th1/Th17 profile (12), which in turn could be due to the inflammatory infiltration observed.

Cardiac lesions have been reported in underage individuals positive to *T. cruzi* infection in Mexico. On ECHO, asymptomatic patients showed incipient lesions, while symptomatic patients exhibited severe lesions like hypertrophy, septum thickening, and ventricle enlargement in some cases; these lesions had been reported in adults with years-long, chronic cardiomyopathy (12, 13). However, while cardiac damage can be demonstrated in these patients, the underlying histopathologic processes cannot be studied because of the invasive nature of biopsy sampling. Although the pathogenesis of Chagas disease is a topic under extensive research, there are few evidences on the progression of lesions, since case studies only show severe, chronic, or postmortem pathologies (13). Thus, this work is aimed to identify the acute and chronic phases in the progression of Chagas disease in a murine experimental model, to analyze the correlation between the presence of *T. cruzi*, the infiltration as a cellular immune response, and the ensuing fibrosis.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

The Querétaro (Qro) strain (ITRI/MX/1986/QRO), characterized by its high virulence in mice (14), was used. This strain was first isolated in 1986 from the bug species *Triatoma barberi*, by researchers from the Laboratory of Parasite

Biology, Faculty of Medicine, UNAM, in a region where human cases of Chagas disease have been described (15).

Mouse Infection

Mice were maintained in an animal facility under constant noise-free environmental conditions at a room temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$, a 12/12 h light-darkness cycle and with access to food and water *ad libitum*. Mice were used and handled by trained personnel in accordance with all ethical considerations in the official standard (NOM-062-ZOO-1999). This study was approved by the Commissions of Research and Ethics of the División de Investigación at the Facultad de Medicina, UNAM.

Eighty CD-1, female, 28-g mice were intraperitoneally (i.p.) administered with either 1,000 parasites (55 infected mice) or with 100 μL of sterile 0.9% saline solution (30 control mice). For parasitemia determinations, blood samples were obtained by cutting the distal portion of the tail every 72 h; parasite counts were performed in a Neubauer chamber in 10 μl of blood diluted 1:9 with PBS.

Obtaining Serum Samples

Every 10 days, five mice were randomly selected and euthanized, and blood samples were taken by cardiac puncture. After clot formation, blood samples were centrifuged at 2,500 rpm/15 min; the serum was separated from cells, glycerinated (50%v/v), and stored at -45°C until analyzed.

Animal Euthanasia

All mice were euthanized using appropriate CO_2 exposure technique. The animal(s) were placed in a clean and empty chamber, the flow of CO_2 was started at a rate of 3 L/min as gas levels rise to 50%, unconsciousness was detected by a loss of the righting reflex. CO_2 flow were maintained for at least 1 min after respiratory arrest. Death must be verified after euthanasia and prior to disposal in agreement to the official guidelines (NOM-087-SEMARNAT SSA1- 2002).

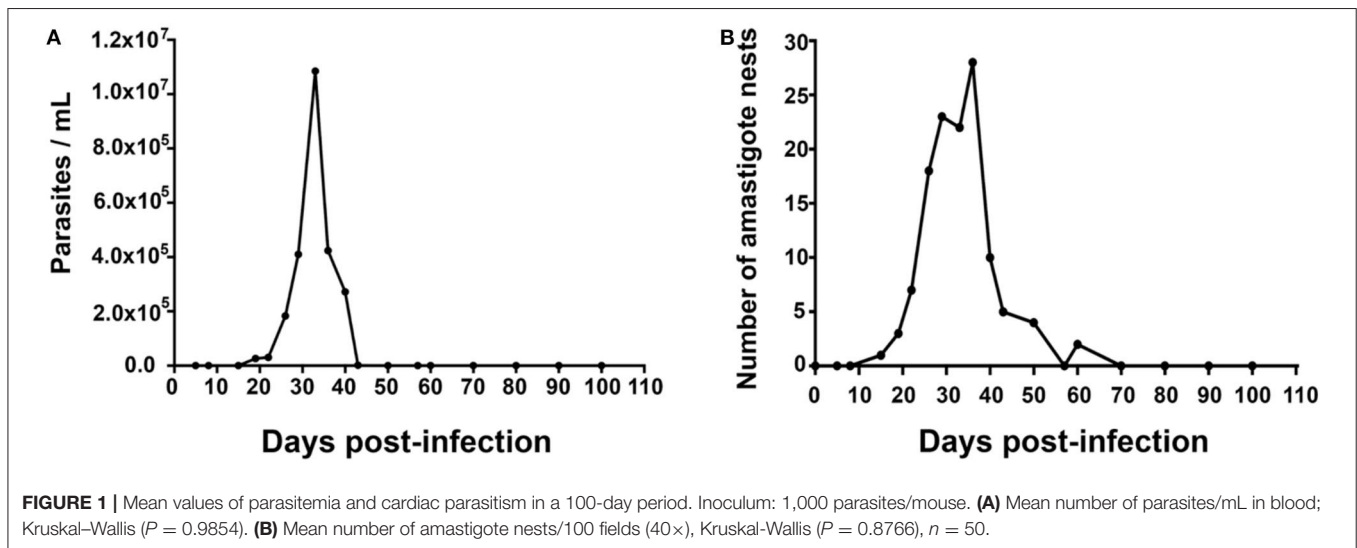
Histopathological Analysis

After euthanasia every 10 days, five infected and five control mice were perfused with PBS and then with 4% paraformaldehyde (PFA). Then, the heart was removed from each mouse, and a sagittal section was made in the ventricles. The excised ventricles were kept in PFA at 4°C until processed. Cardiac tissue samples were dehydrated, included in paraffin, cut with a rotary microtome into 4- μm slides, and stained with the hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome techniques.

The presence of amastigote nests and cell infiltration was determined in HE-stained slides. To determine the presence of amastigote nests, 100 fields were observed under a 40 \times objective in a light microscope. The presence or absence of unifocal or multifocal collagen fibers was determined in Masson-stained slides.

Lesion Classification

The criteria used to determine the presence of fibrotic lesions were defined according to Mewton in 2011 (16), based on the evidence of fine collagen fibers with a clear background, infiltration, and disruption and/or destruction of two or more



adjacent myocardiocytes; any tendinous tissue, bundle of His, or auricular, and venous endothelium were excluded. Fibrotic lesions were classified as either unifocal or multifocal.

Determining IgG Anti-*T. cruzi* Antibodies

IgG anti-*T. cruzi* antibodies were detected in serum samples by indirect ELISA on a microplate (Costar 3590, Corning, NY, USA). The Qro antigenic extract and the conjugated antibody were previously standardized. The antigen was incubated for 12 h at 4°C, washed three times with PBS/0.05% Tween 20, and blocked with PBS/5% milk for 60 min at room temperature.

Serum samples (diluted 1:100) were incubated for 30 min at 37°C. Then, 100 μ L of conjugated antibody were added (anti-mouse IgG-HRP diluted 1:3000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and incubated for 30 min at 37°C. The plates were washed five times, and the substrate/chromogen mixture (hydrogen peroxide in citrate buffer solution pH 5, OPD) was added. The reaction was stopped after 15 min by adding 100 μ L/well of sulfuric acid 1 N. Optical density (O.D.) was read in a microplate spectrophotometer (Epoch BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at 490 nm. The cut off value was calculated with the mean O.D. value of negative serum samples + 2–3 standard deviations (17).

Photomicrographs

The images were obtained in an Olympus microscope (Shinjuku, Tokyo, Japan) with 40 and 100 \times objectives and an EOS Rebel T6i camera (Canon, Ota, Tokyo, Japan), fitted with a T₂ ocular adapter (Amscope, Irvine, CA, USA).

Statistical Analysis

The Spearman correlation coefficient was calculated to assess correlations among the variables under study (parasitemia levels, amastigote nests, presence of infiltration, and fibrotic lesions); correlation is stronger as the value of r approaches 1. All analyses were performed with the GraphPad Prism software for Windows v.6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Parasitemia and Cardiac Parasitism

Parasites were detectable in blood on day 15 post-infection (dpi), with a value of 0.03×10^6 parasites/mL, reaching a maximum of 2.018×10^7 parasites/mL on 30 dpi. Then, parasitemia levels dropped to zero on 43 dpi. Amastigote nests were detected in heart tissues on 15 dpi and remained detectable until 62 dpi (Figures 1A,B).

Histopathological Analysis

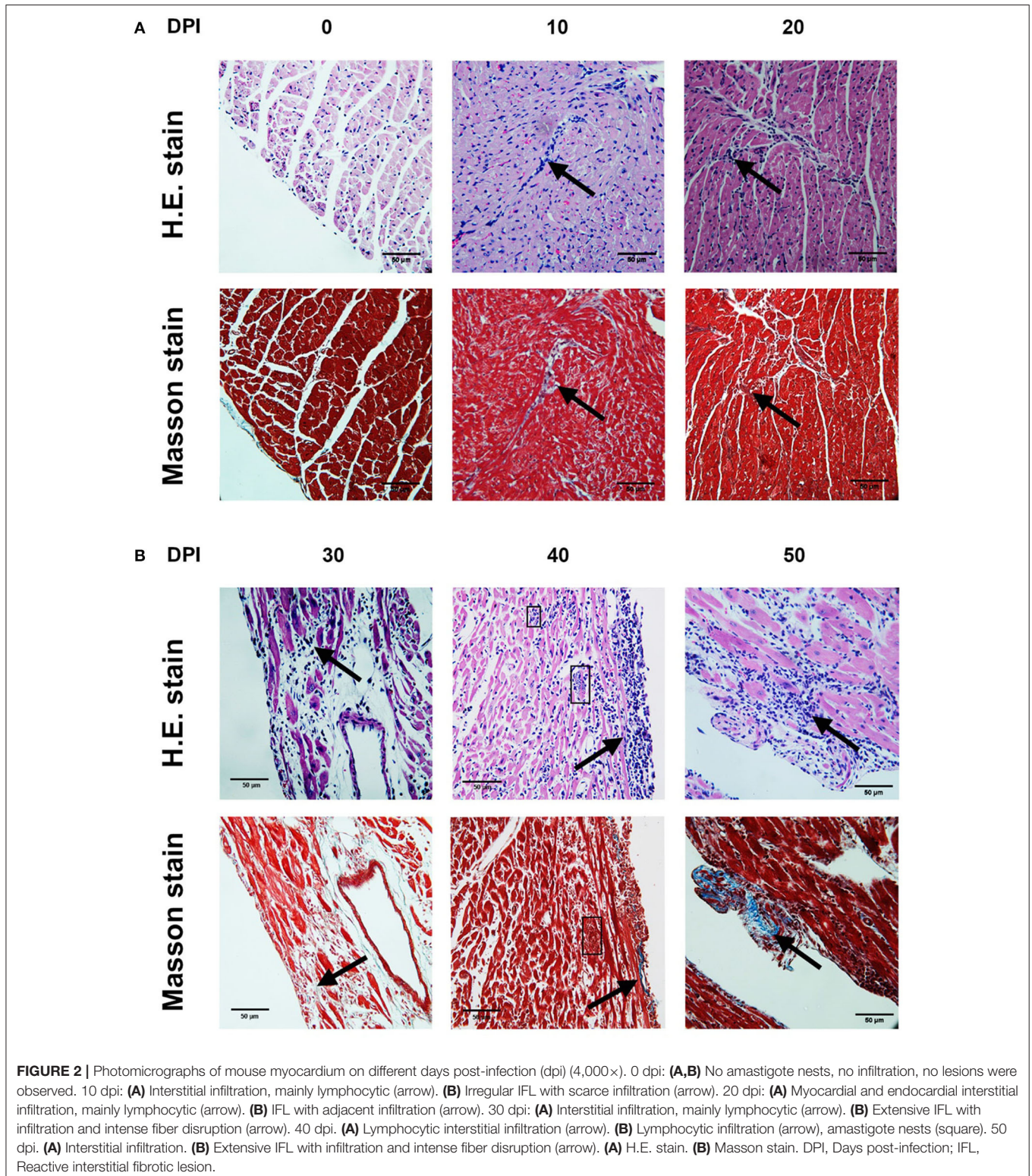
The highest number of amastigote nests was observed between 30 and 40 dpi, decreasing continuously until 62 dpi, when no amastigote nests were detectable anymore. The nests were accompanied by reactive interstitial fibrosis, with the distinctive presence of fine collagen fibers. Lymphocytic infiltration persisted along with fibrotic lesions, and it progressed to cicatricial fibrosis replacing myocardium tissues (Figures 2, 3).

Infiltration Composition

Three histological patterns of inflammatory infiltration were identified in the period under study. The first one showed a marked predominance of lymphocytes, with scarce macrophages (8–100 dpi); the second pattern, named as mixed, showed abundant lymphocytes, scarce macrophages, and occasional neutrophils (10 and 45 dpi); the third pattern only showed lymphocytes (46 and 60 dpi). Interestingly, plasma cell conglomerates were identified in six mice (43 and 60 dpi) (Figure 4).

Infiltration Location

Cellular infiltration was mostly located in myocardial tissues on 8 dpi, with a maximum prevalence on 15–29 dpi, and in the three layers of the heart wall on 19 dpi, with a maximum prevalence on 60 dpi. Cases of pancarditis (simultaneous endocarditis, myocarditis, and pericarditis) were identified on 43–57 dpi, and perivasculitis with capillary dilation was observed on 60–100 dpi (Figure 5).

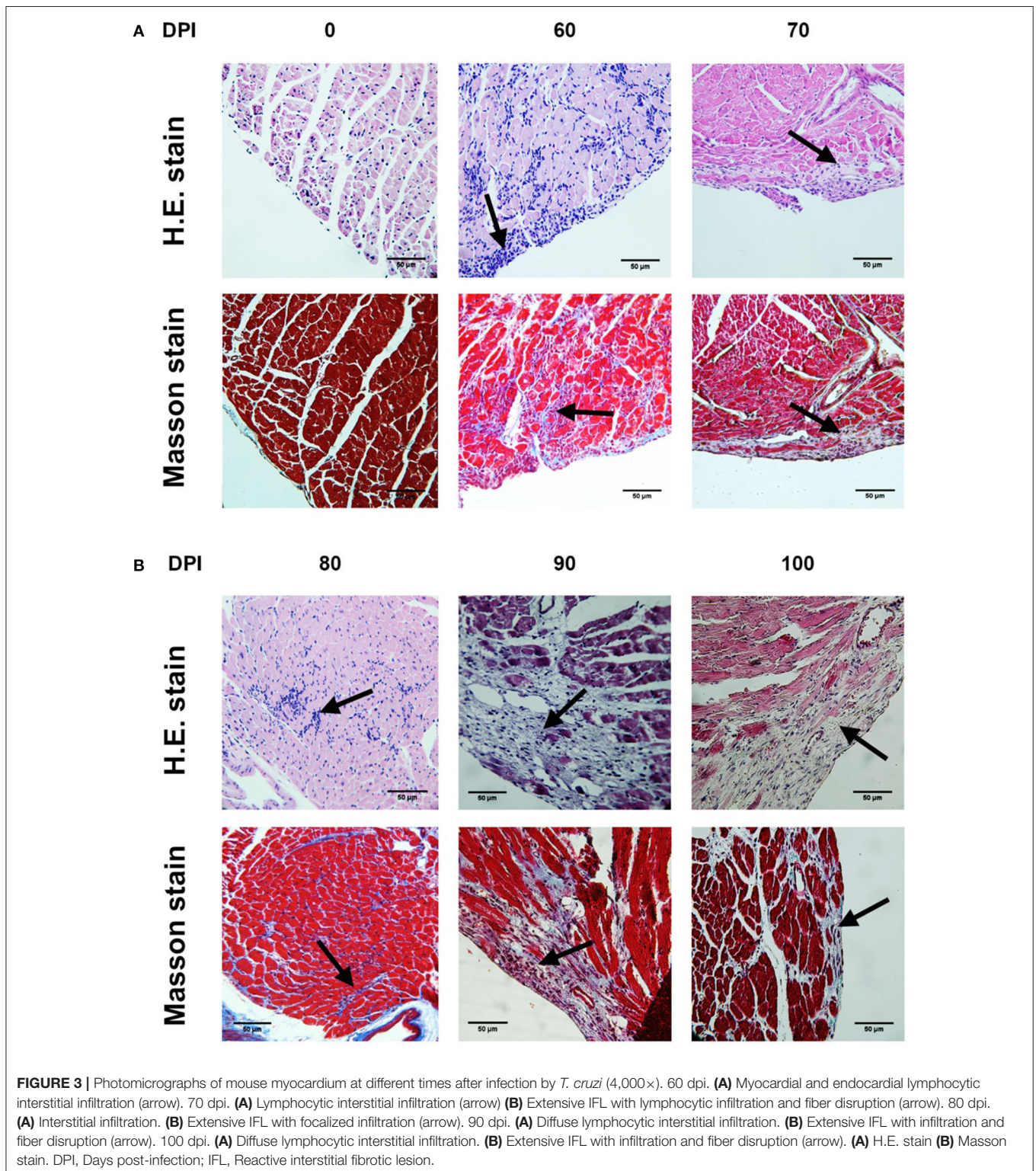


Prevalence of Fibrotic Damage

An unifocal fibrotic pattern was observed on 8 dpi, with a maximum on 19–29 dpi; a multifocal pattern was mainly observed on 33–100 dpi; myocytolysis was found on 60–100 dpi (Figure 6).

Antibody Detection in Mice

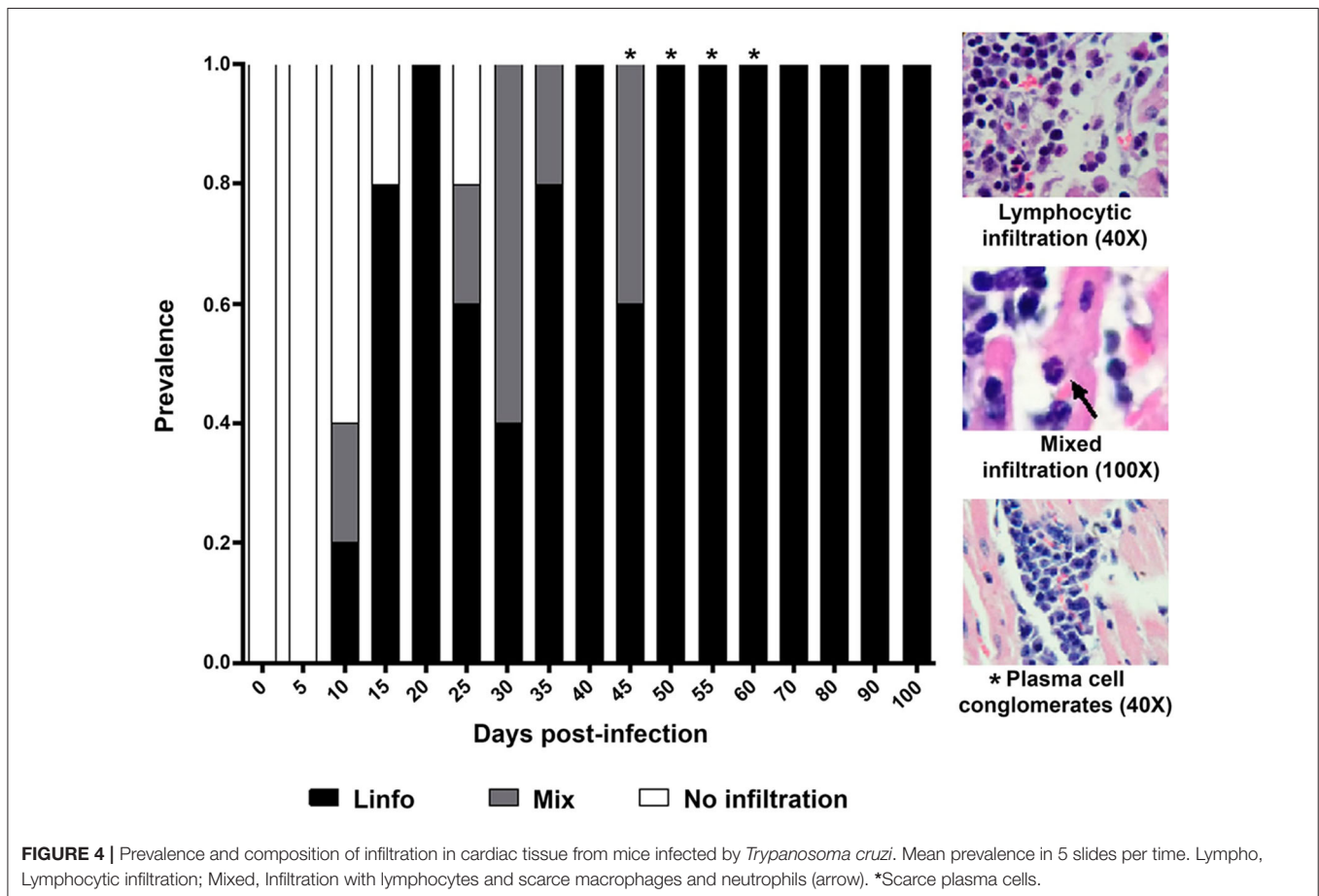
Mouse serum samples were positive to anti-*T. cruzi* antibodies on 40 dpi, with reactive titers showing a continuous increase until 90 dpi; no reactivity was observed in control animals (Figure 7).



Correlation Among the Variables Under Study

The Spearman analysis showed a weak, positive correlation between the presence of amastigotes and fibrotic lesions

(Figure 8), a positive correlation between cellular infiltration and fibrotic lesions (Figure 9), and a strong, positive correlation between the number of amastigote nests and parasitemia levels (Figure 10).



DISCUSSION

Two well-defined phases have been observed in the natural history of Chagas disease in humans, the acute and the chronic phase. The acute phase is characterized by the presence of parasites in the blood; it usually lasts 2–4 months, mainly depending on factors like the host's age, sex, immune status, and comorbidities, as well as the transmission route. In our murine model, parasitemia was observed in the period 15–40 dpi (Figure 1A), while cardiac parasitism was observed on 19–62 dpi (Figure 1B). The microscopically sub-patent parasitaemia do not have to be interpreted as a total elimination of *T. cruzi*, previous works have reported parasites in foci of variable spatial distribution including skeletal muscle, liver, abdomen, mouth/snout, and a variety of lymph nodes (3, 18). Thus, the aim of the present work was to define the acute phase and our findings suggested that a duration of 62 days can be defined for the acute phase in the murine model.

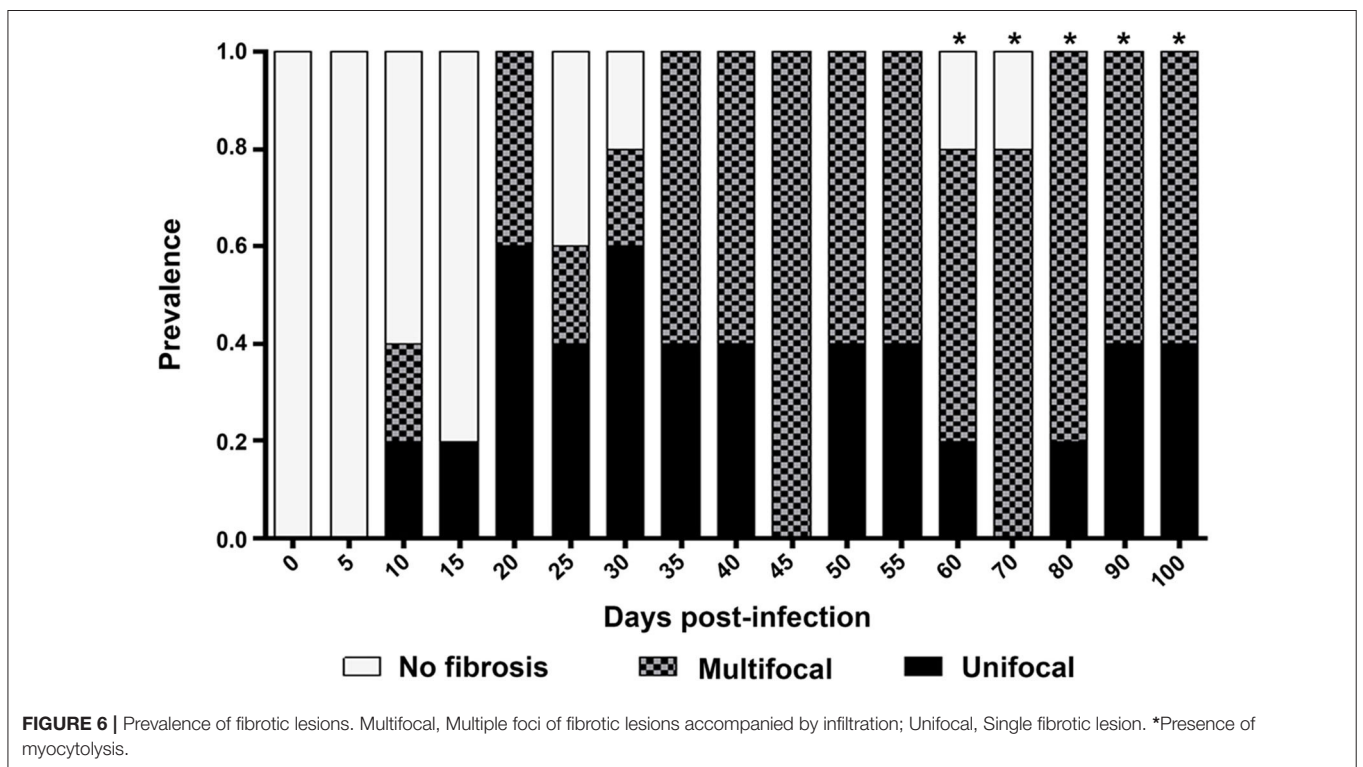
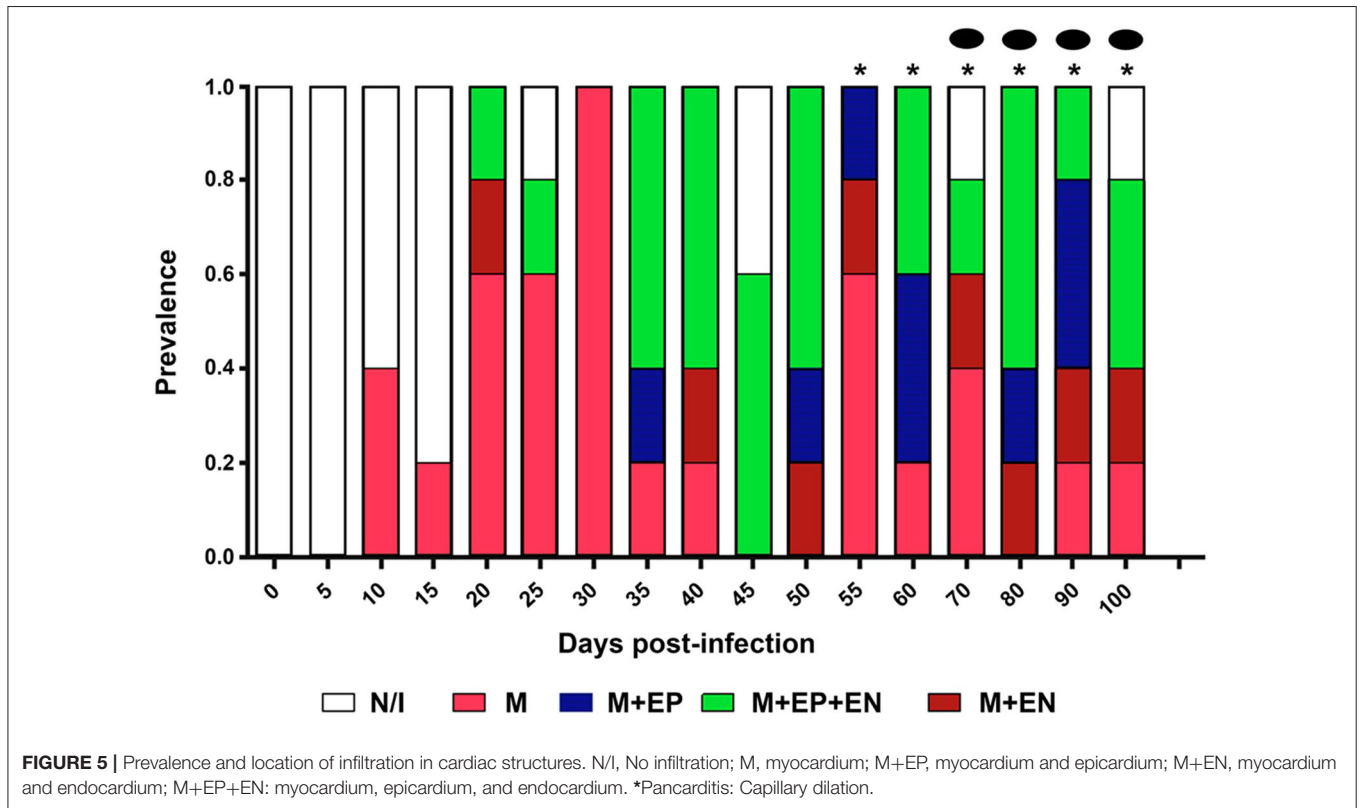
Infiltration Composition

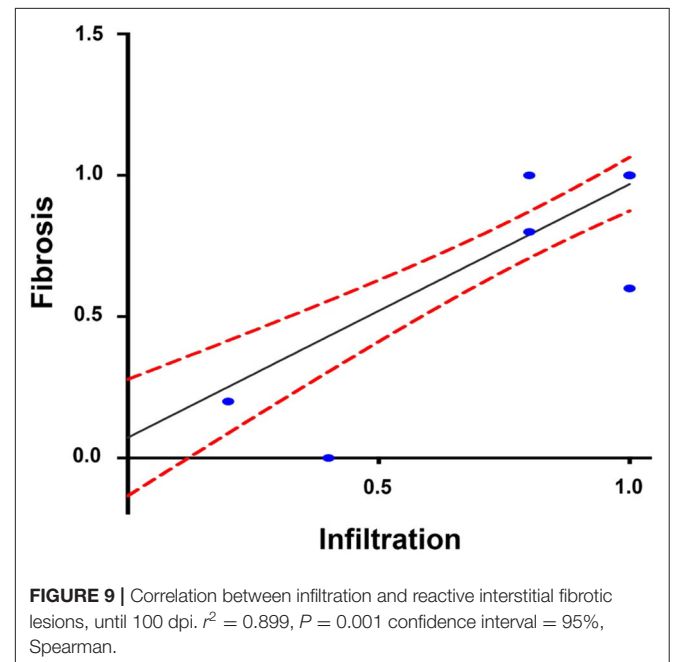
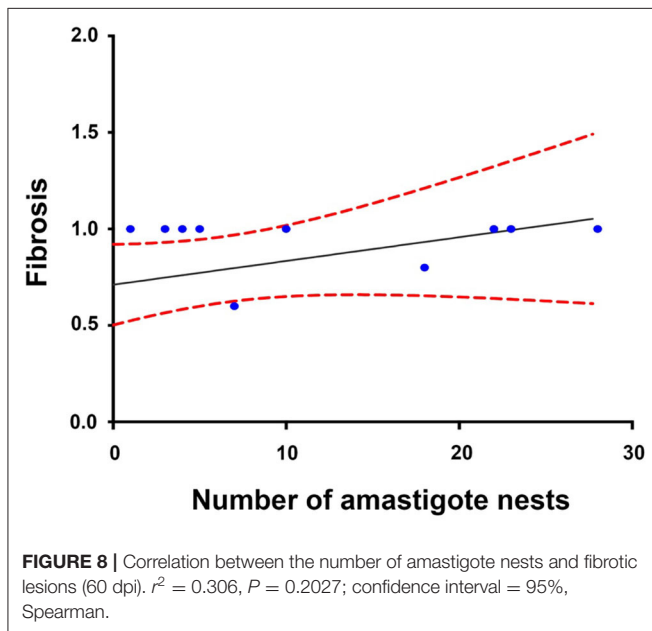
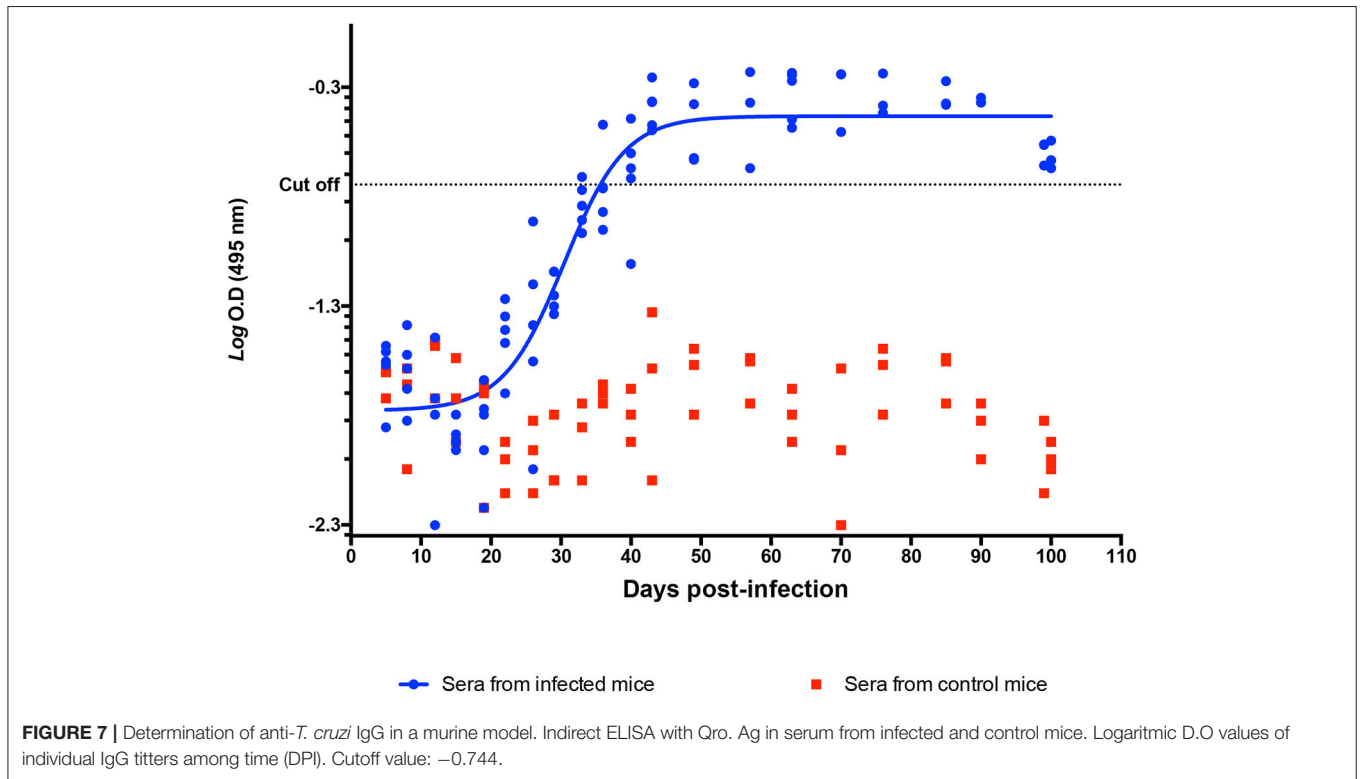
Cellular infiltration mostly composed of lymphocytes, with scarce macrophages, was observed in mouse myocardial tissues within the period 0–60 dpi (Figures 2–4). It is noteworthy that inflammatory foci with predominance of neutrophils, macrophages, and eosinophils are observed in the acute phase

of the human disease, these cells are involved in the control of the early infection by releasing NETs and cytokines (19, 20). In mice, neutrophils were observed on the days with the highest parasitemia levels (30 dpi) (Figures 1A, 4), while the absence of eosinophils is notable; the lymphocyte predominance, with scarce macrophages could be explained by immunodepression, as it has been previously described (21–23). Finally, it should be noted the persistent presence of lymphocytes with no macrophages on 60–100 dpi, probably as a Th1/Th17-type lymphocytic response, which has an important contribution to the inflammatory process as the disease progresses to chronicity (12, 24).

Infiltration Location

Cellular infiltration was mostly observed in the myocardium, with few foci in endocardial and pericardial tissues (Figure 5). While the cardiac tropism of the parasite has been described as predominantly affecting myocardial tissues, there is evidence of the presence of lymphocytic foci in the pericardium the subendocardial region (5, 25), epicardium, and endocardium (on days 35–45) (7) of mice. The myocardium is the first affected layer; then, cellular infiltration spreads to the periphery, to the epicardium, and pericardium, and to a lesser degree, to the endocardium (Figure 5); these results allow us to infer that





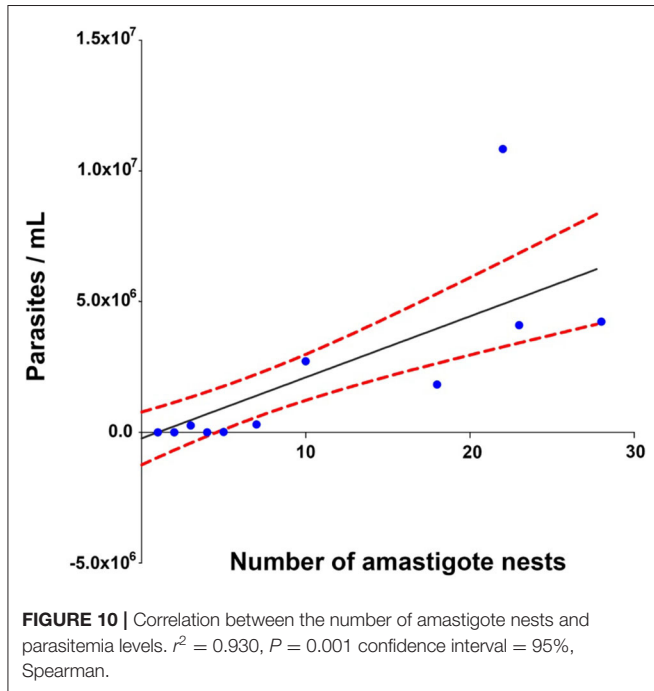
the presence of lymphocytic foci triggers the distinctive heart enlargement observed in Chagasic chronic cardiopathy.

Prevalence of Fibrotic Damage

During the acute phase (1–62 dpi) (Figures 1A,B), it was clear the presence of reactive, unifocal interstitial fibrotic lesions, as it

is seen on the Masson stained slides (Figure 2, 10–60 dpi) as a continuous repairing mechanism, which could be the beginning of the replacement processes with fibrosis and scarring described in the chronic disease, (16). The multifocal lesions observed on 60–100 dpi (Figure 6) could correspond to chronic lesions in

human cases (12, 26), for which fibrosis is the hallmark (27). Extensive fibrosis, probably cicatricial in origin, which further deteriorates the cardiac function, was observed in our murine model by day 100 (Figures 3, 6, 90–100 dpi).



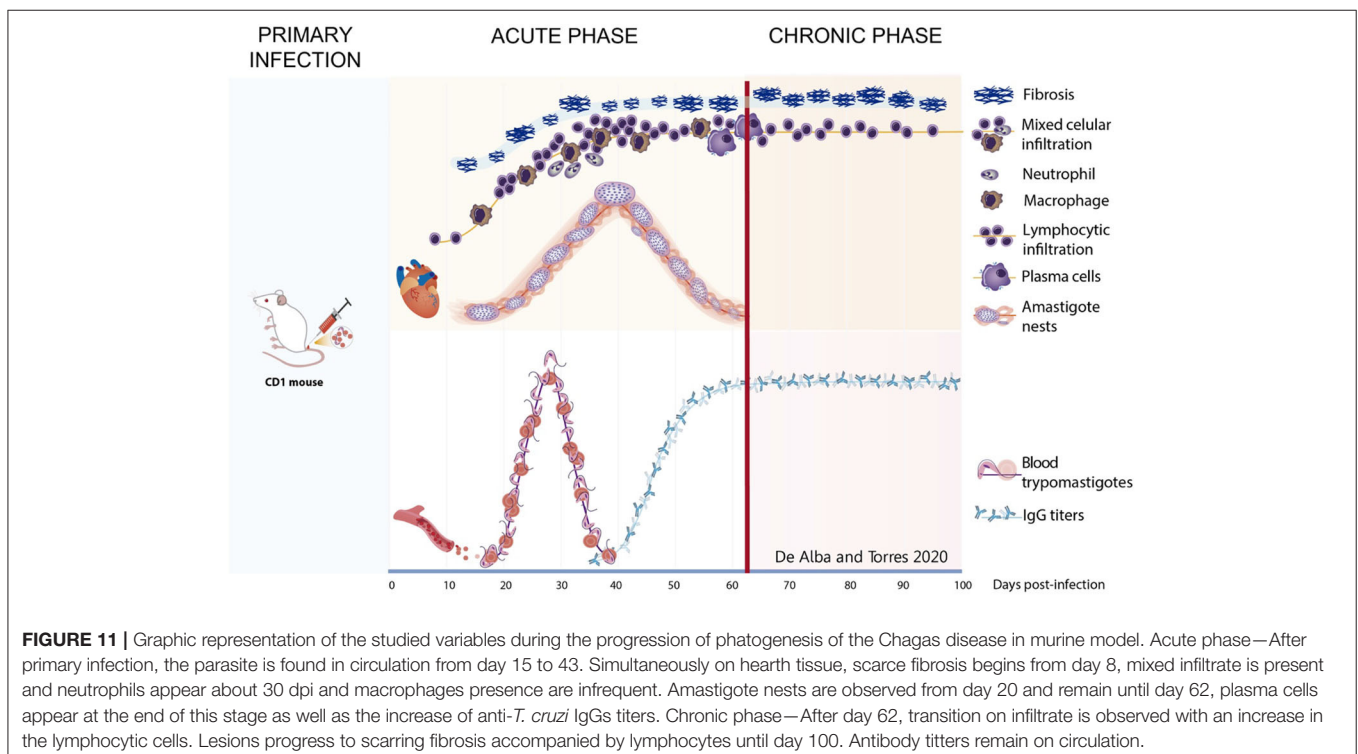
Antibody Detection

The chronic phase is characterized by the absence or an undetectable (by conventional methods) presence of parasites in the host's blood and tissues (1, 27); along with the detection of serum antibodies, this absence is a marker of the clinical progression of the disease. In our study, the transition from the acute to the chronic phase occurred between 60 and 70 dpi, when the parasite could not be detected neither in cardiac tissue nor in blood by the usual methods. An IgG humoral response was observed after the third week post-infection, and the highest antibody titers were determined on 60–70 dpi (Figure 7); this was the end of the acute phase, linked to the absence of the observed parasite on 62 dpi, and the beginning of the chronic stage in our model.

Correlation Among Variables

A positive correlation was found between the presence of lymphocyte infiltration and the presence of fibrotic lesions, both interstitial and cicatricial (Figure 9); in contrast, only a weak correlation was observed between the presence of parasites and fibrosis (Figure 8). Both findings are in agreement with previous studies (13), and are due to the fibrosis secondary to the presence of the parasite (Figure 3, 90 and 100 dpi). On the other hand, the strong correlation between the presence of infiltration and lesions highlights the relevance of studying the role of the predominantly lymphocytic inflammatory response on the pathogenesis and progression of Chagas disease (Figure 9).

Other studies by our team have reported incipient chronic-phase cardiac lesions in underage human patients, with septal and posterior wall hypertrophy, probably due to inflammatory and



fibrotic myocardial processes and leading to an impaired cardiac function. The histopathology of the fibrotic lesions observed in our murine model could correspond to these incipient lesions in human cases (12, 13).

The characteristics of the acute and chronic phases in our murine model are summarized in **Figure 11**; the acute phase was characterized by parasitemia and cardiac parasitism associated to mixed and lymphocytic infiltration, as well as very fine collagen fibers; in the transition to the chronic phase, the number of amastigote nests decreased while IgG titers increased. The chronic phase was characterized by lymphocyte infiltration and extensive cardiac fibrotic lesions, along with high serum antibody titers.

Finally, histopathological analysis demonstrated the presence of vacuolar spaces that could result of the nine cycles of binary fission in amastigotes that occur after the infection (28, 29).

CONCLUSIONS

Our work demonstrates that the acute phase in our murine model lasts for 62 days, with the chronic phase beginning at the end of this period. A continuous fibrotic damage is observed since the acute phase, and suggests a progression starting at the time of infection; this progressive damage, along with the lymphocytic infiltration, leads to cardiac hypertrophy with cavity dilation and the dysfunction that characterizes Chagasic cardiopathy. Also we can conclude that our murine model behaves in a similar manner as the human disease, and therefore it is suitable to study Chagas disease.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comisión de Investigación y Ética, División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- Chagas C. Nova tripanozomíase huiana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do schizotrypanum cruzin genn. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1909) 1:159–218. doi: 10.1590/S0074-02761909000200008
- Rojo-Medina J, Ruiz-Matus C, Salazar-Schettino PM, González-Roldán JF. Enfermedad de chagas en México. *Gac Med Mex.* (2018) 154:605–12. doi: 10.24875/GMM.18004515
- Salazar-Schettino PM, Jimenez JM, Tay J, Cardenas Ramirez, L. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* en el raton blanco. *Rev Latinoam Microbiol.* (1978) 20:51–7.
- Salazar-Schettino PM, Tay J, Navarrete F, Ramos, S. Comportamiento en el ratón de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* de peculiar virulencia. *Rev Invest Salud Publica.* (1975) 35:37–45.
- Pizzi PT, Wallace RA, Villagra OR, Muñoz VS, Ortiz ZS, Solari IA. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. *Rev Med Chil.* (2005) 133:432–8. doi: 10.4067/S0034-98872005000400006
- Tafuri WL. Immunopathology of chagas disease - a historical overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1999) 94:247–8. doi: 10.1590/S0074-02761999000700040
- Torres CM. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1941) 36:391–404. doi: 10.1590/S0074-02761941000300015
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor β (TGF- β). *J Exp Med.* (1991) 174:539–45. doi: 10.1084/jem.174.3.539
- Savino W, Villa-Verde DMS, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki M, et al. Gea Cytokines S, and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2007) 18:107–24. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.010

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD: protocol design, standardizing and performing experimental procedures, and manuscript drafting. PS-S, MB-T, and MC-B: final editing of manuscript and approbation for publication. PS-S, MC-B, MB-T and MD: concept and design of the work, purchase of consumables and reagents for the experiments, analysis and interpretation of results, and critical review of the manuscript. EZ: consultancy in immunological and biochemical aspects for result evaluation and interpretation and critical review of the manuscript. RG-A: organ processing, sectioning, and staining. ES-C and MD: analysis and interpretation of histopathological lesions. ET-G: ELISA standardization in mouse sera, result analysis and interpretation, and design of images. MH-L: antibody detection in mouse sera by ELISA. OR-D and YG-G: entering results in databases and support in statistical interpretation and result analysis.

FUNDING

This study was partially financed by DGAPA/PAPIIT, Grant No. IN-216118 (registration FM/025/2015) and IN-211613 (registration FM/074/2012). Faculty of Medicine, UNAM, FM/DI/022/2017 and FM/DI/090/2018.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the scholarship. This study constitutes a partial fulfillment of the doctoral work of MA in the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Thanks to Faculty of Medicine, and the Laboratory of Parasite Biology, UNAM. Special thanks to Dr. María Isabel García Peláez for her support in organ processing, Biol. Mauro Omar Vences Blanco for his support in maintaining the mouse strain, and Berenice González Rete, M.Sc., for her assistance in mouse inoculation.

10. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* (2011) 24:592–630. doi: 10.1128/CMR.00063-10
11. Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, et al. Frequency of interferon- γ -producing t cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human chagas disease. *J Infect Dis.* (2004) 189:909–18. doi: 10.1086/381682
12. De Alba-Alvarado M, Salazar-Schettino PM, Jiménez-Álvarez L, Cabrera-Bravo M, García-Sancho C, Zenteno E, et al. Th-17 cytokines are associated with severity of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in pediatric patients from endemic areas of Mexico. *Acta Trop.* (2018) 178:134–41. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.009
13. Salazar-Schettino PM, Cabrera-Bravo M, Vazquez-Antona C, Zenteno E, De Alba-Alvarado M, Torres Gutierrez E, et al. Chagas disease in Mexico: report of 14 cases of chagasic cardiomyopathy in children. *Tohoku J Exp Med.* (2016) 240:243–9. doi: 10.1620/tjem.240.243
14. Espinoza B, Rico T, Sosa S, Oaxaca E, Vizcaino-Castillo A, Caballero ML, et al. Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotechnol.* (2010) 2010:890672. doi: 10.1155/2010/890672
15. Salazar-Schettino PM, Perera R, Ruiz-Hernandez AL, Bucio Torres MI, Zamora-Gonzalez C, Cabrera-Bravo M, et al. Chagas disease as a cause of symptomatic chronic myocardopathy in mexican children. *Pediatr Infect Dis J.* (2009) 28:1011–3. doi: 10.1097/INF.0b013e3181ad8425
16. Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima JAC. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol.* (2011) 57:891–903. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.013
17. Cura EN, Wendel S. *Manual de Procedimientos de Control de Calidad Para Los Laboratorios de Serología de Los Bancos de Sangre.* Washington, DC (1994)
18. Lewis MD, Fortes Francisco A, Taylor MC, Burrell-Saward H, Mclatchie AP, Miles MA, et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol.* (2014) 16:1285–300. doi: 10.1111/cmi.12297
19. Köberle F. Chagas' disease and chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol.* (1968) 6:63–116. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60472-8
20. Chen L, Watanabe T, Watanabe H, Sendo F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1 / Th2 dichotomy in different directions. *Eur J Immunol.* (2001) 31:265–75. doi: 10.1002/1521-414120010131:1<265::AID-IMMU265>3.0.CO;2-L
21. Sousa-Rocha D, Thomaz-Tobias M, Diniz LFA, Souza PSS, Pinge-Filho P, Toledo KA. *Trypanosoma cruzi* and its soluble antigens induce NET release by stimulating toll-like receptors. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0139569. doi: 10.1371/journal.pone.0139569
22. Kierszenbaum F, Budzo D, B. *Trypanosoma cruzi*: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells. *Parasite Immunol.* (1982) 4:441–51. doi: 10.1111/j.1365-3024.1982.tb00455.x
23. Gomes JAS, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Vitelli-Avelar D, Sathler-Avelar R, et al. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology.* (2012) 217:1005–16. doi: 10.1016/j.imbio.2012.01.014
24. Cardoni RL, Antunez MI, Abrami AA. Respuesta TH1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina.* (1999) 59:84–90.
25. Cárdenas Ramírez L, Tay J, Salazar Schettino PM. Cambios histopatológicos producidos en el ratón por cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Invest Salud Publica.* (1976) 35:131–53.
26. Higuchi MDL, Benvenuti LA, Reis MM, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* (2003) 60:96–107. doi: 10.1016/S0008-6363(03)0361-4
27. Viotti V. *Enfermedad de Chagas un Enfoque Práctico Basado en la Investigación Médica.* Buenos Aires (2015).
28. Rossi MA. The pattern of myocardial fibrosis in chronic chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* (1991) 30:335–40. doi: 10.1016/0167-5273(91)90012-E
29. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic chagas heart disease. *Circulation.* (2007) 115:1109–23. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 De Alba-Alvarado, Bucio-Torres, Zenteno, Sampedro-Carrillo, Hernández-Lopez, Reynoso-Ducoing, Torres-Gutiérrez, Guevara-Gomez, Guerrero-Alquicira, Cabrera-Bravo and Salazar-Schettino. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.